

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Marek Harvila

**STANOVENÍ 5-HYDROXYINDOLOCTOVÉ KYSELINY POMOCÍ
HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ**

DETERMINATION OF 5- HYDROXYINDOLEACETIC ACID USING HPLC WITH
ELECTROCHEMICAL DETECTION

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Hany Dejmkové, Ph.D, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků této práce mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

podpis

Tato diplomová práce vznikla za podpory Grantové agentury České Republiky (Projekt P206/12/G151)

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, připomínky, cenné rady a veškerou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále chci poděkovat kolektivu a všem členům laboratoře č. 112 za přátelské prostředí a příjemnou pracovní atmosféru. A v neposlední řadě patří díky přátelům a především mé rodině za podporu a možnost studovat na vysoké škole.

Klíčová hesla: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Bórem dopovaná diamantová filmová elektroda
5- Hydroxyindoloctová kyselina

Klíčová slova: Elektrochemická detekce
Spektrofotometrická detekce
Neuroendokrinní tumory
Biomarkery

Key Words Plus: High Performance Liquid Chromatography
Boron-Doped Diamond Thin Film Electrode
5-Hydroxyindoleacetic acid

Key Words: Electrochemical Detection
Spectofotometric Detection
Neuroendocrine Tumors
Biomarkers

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením 5-hydroxyindoloctové kyseliny (5-HIAA) pomocí HPLC s amperometrickou detekcí na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE) v matrici lidské moči. 5-hydroxyindoloctová kyselina je finálním metabolitem hormonu serotoninu a slouží jako biomarker pro diagnostiku přítomnosti karcinoidního tumoru vyskytující se nejhojněji v gastrointestinálním traktu a v plících lidského těla.

Metoda stanovení byla úspěšně optimalizována, podmínky separace byly: kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μ m), průtoková rychlost 0,5 ml·min⁻¹, gradientová eluce s následujícím programem gradientu: 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr,v/v), dávkováno bylo 20 μ l vzorku. Optimalizovány byly i podmínky detekce: vlnová délka UV spektrofotometrického detektoru byla nastavena na 276 nm a amperometrická detekce na borem dopované diamantové filmové elektrody probíhala při potenciálu 1,1 V oproti argentochloridové referenční elektrodě.

Oběma detekčními technikami byly proměřeny koncentrační závislosti roztoků standardu v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ a potvrzena jejich linearita. Pomocí nejnižší koncentrační řady $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ byly stanoveny na základě poměru signál/šum mez detekce a stanovitelnosti. Pro spektrofotometrickou detekci bylo dosaženo meze detekce $8,84 \cdot 10^{-8}$ mol·l⁻¹ a meze stanovitelnosti $2,95 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹. Pro elektrochemickou detekci bylo dosaženo meze detekce $1,19 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ a meze stanovitelnosti $3,96 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹.

V závěru byla látka stanovena ve vzorku moči. Koncentrace činila pro spektrofotometrickou metodu $(19,12 \pm 3,26) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 6,26$ %) a pro elektrochemickou metodu. $(23,86 \pm 2,69) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 3,42$ %).

Abstract

The diploma thesis focuses on a determination of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in human urine using a boron-doped diamond film electrode (BDDFE). 5-HIAA is the main final metabolite in the serotonin metabolic pathway and it is used as a biomarker for the diagnosis of carcinoid tumors. These tumors are mostly localized in gastrointestinal tract and lungs.

The determination method was successfully optimized, the separation conditions were as follows: column LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5µm), mobile phase flow rate 0,5 ml·min⁻¹, mobile phase was composed of methanol and acetate-phosphate (AF) buffer with pH 3, the pump was working in gradient mode with following gradient programme: 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-buffer,v/v), the amount of analyte solution used was 20 µl. The detection parameters were also optimized for both UV detection (using 276 nm wavelength) and amperometric detection (BDDF electrode with applied voltage of 1,1 V and silver chloride electrode as reference electrode).

Concentration dependence of 5-HIAA was measured within the concentration range of $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ and the linearity in this range was proved. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were established based on the signal/noise ratio from the lowest calibration range of $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹. For spectrophotometric detection, LOD was $8.84 \cdot 10^{-8}$ mol·l⁻¹ and LOQ was $2.95 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹. For electrochemical detection, LOD was $1.19 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ and LOQ was $3.96 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹.

Finally, the determination of 5-HIAA in the sample of human urine was performed. The concentration obtained with the spectrophotometric method was $(19.12 \pm 3.26) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 6.26\%$) while with the electrochemical method it was $(23.86 \pm 2.69) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 3.42\%$)

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1. Cíl práce	11
1.2. Tumorové markery	12
1.3. 5-HIAA jako marker karcinoidních tumorů a jiných nemocí	12
1.3.1. Hlavní metabolická dráha.....	13
1.3.2. Klinické stanovení 5-HIAA v moči	14
1.4. Borem dopovaná diamantová filmová elektroda.....	15
1.4.1. Příprava borem dopovaných diamantových elektrod.....	16
1.4.2. Využití borem dopovaných diamantových filmových elektrod	17
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
2.1. Studovaná látka	18
2.2. Použitá aparatura a metody	19
2.2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	19
2.2.2. Další zařízení.....	20
2.3. Pracovní postupy a reagentie	21
2.3.1. Stanovení HPLC s UV a ED detekcí.....	21
2.3.2. Charakterizace pracovní elektrody - Aktivace BDDFE	21
2.3.3. Příprava roztoků	22
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	23
3.1. Studium stálosti zásobního roztoku 5-HIAA	23
3.2. Optimalizace metody.....	24
3.2.1. Poměr obsahu metanolu v mobilní fázi.....	24
3.2.2. Závislost signálu na pH prostředí a potenciálu pracovní elektrody	26
3.2.3. Opakovatelnost měření.....	28
3.3. Kalibrační závislost	29
3.3.1. Spektrofotometrická detekce.....	29
3.3.2. Elektrochemická detekce.....	33
3.4. Stanovení 5-HIAA v reálné matrici.....	38

3.4.1 Vývoj gradientu – optimalizace separace.....	38
3.4.2 Kalibrační závislost v matrici.....	40
3.4.2.1. Spektrofotometrická detekce	40
3.4.2.2. Elektrochemická detekce.....	42
3.5. Stanovení 5-HIAA v moči metodou standardního přídávku.....	45
Závěr.....	48
Reference.....	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HIAA	5-Hydroxyindolactová kyselina
A	Absorbance
AF-pufr	Acetátofosfátový pufr
A_P	Plocha píku
AU	Absorbance Unit
BDDFE	Borem dopovaná diamantová filmová elektroda
c	Koncentrace
CAS RN	Chemical Abstract Services Registry Number
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
E	Potenciál
E_{prac}	Potenciál pracovní elektrody
ED	Elektrochemická detekce, elektrochemický detektor
F	Průtoková rychlost mobilní fáze
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
h_P	Výška píku
I	Proud
λ	Vlnová délka
$L_{1,2}$	Interval spolehlivosti
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti

MeOH	Methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
n	Počet měření
p.a.	Pro analýzu
pK _A	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity hydroxoniových iontů
R^2	Druhá mocnina korelačního koeficientu
RP-18	Kolona pro reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
s	Směrodatná odchylka
SOP	Standardní pracovní postup
s_r	Relativní směrodatná odchylka
t	Čas
t_R	Retenční čas
UV	Ultrafialová oblast
v/v	Poměr objemů
VIS	Viditelná oblast

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá hledáním optimálních podmínek pro stanovení biomarkeru 5-hydroxyindolactové kyseliny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na borem dopované diamantové filmové elektrodě s cílem dosažení co nejmenší meze detekce a stanovitelnosti. Praktická aplikovatelnost metody bude ověřena měřením v reálné matrici lidské moči.

Studovaná látka je finálním metabolitem hormonu serotoninu a slouží jako biomarker pro diagnostiku přítomnosti tumoru v lidském těle. Současné způsoby stanovení 5-HIAA v klinické praxi využívají prakticky výhradně optických metod. S ohledem na ekonomickou stránku věci je žádoucí hledat nové techniky, využitím méně nákladné instrumentace a zároveň zachovat, či případně vylepšit detekční limity.

1.2. Tumorové markery

Biomarkery jsou obecně jakékoliv měřitelné diagnostické indikátory, které slouží k posouzení rizika nebo přítomnosti nemoci. Tumorové markery značí přítomnost tumoru a koreluje s jeho biologickým chováním [1]. Jedná se o různorodou skupinu chemických individuí, od jednoduchých organických látek [2], proteinů a enzymů [3-5], až po některé druhy RNA [5, 6] a exosomy [7]. Tyto indikátory se stanovují z krve, moči, nebo tkání. Dřív se jednotlivé markery úspěšně používaly k identifikaci rozlišovacích prvků různých nemocí. U některých tumorů je však takovýto přístup nedostatečný kvůli jejich komplexitě [8, 9]. Například pro neuroendokrinní tumory je k jejich podrobné analýze vhodnější použít několik markerů najednou s využitím specifických algoritmů. K samotné diagnostice ale i v tomto případě postačuje stanovení jednotlivých markerů, přičemž chromogranin B dosahuje 99% sensitivitu a 5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA) téměř 100% specifitu [9].

1.3. 5-HIAA jako marker karcinoidních tumorů a jiných nemocí

Karcinoidní tumory jsou neuroendokrinní maligní novotvary vzniklé z buněk se schopností produkovat serotonin [10]. Vyskytují se přibližně v počtu 1,5 ze 100 tisíc obyvatel [11]. Nejčastějším místem výskytu je gastrointestinální trakt a plíce [12]. Četnost místa výskytu je v České republice jiná v porovnání s údaji ze světa. Ve světě je mnohem častější výskyt karcinoidu v tenkém střevě než v tlustém, zatímco v České republice je to obráceně [11]. Pětiletá míra přežití u lokalizovaného karcinoidu je 65 – 90%, zatímco u metastazujícího karcinomu se pohybuje kolem 14 – 54% [12].

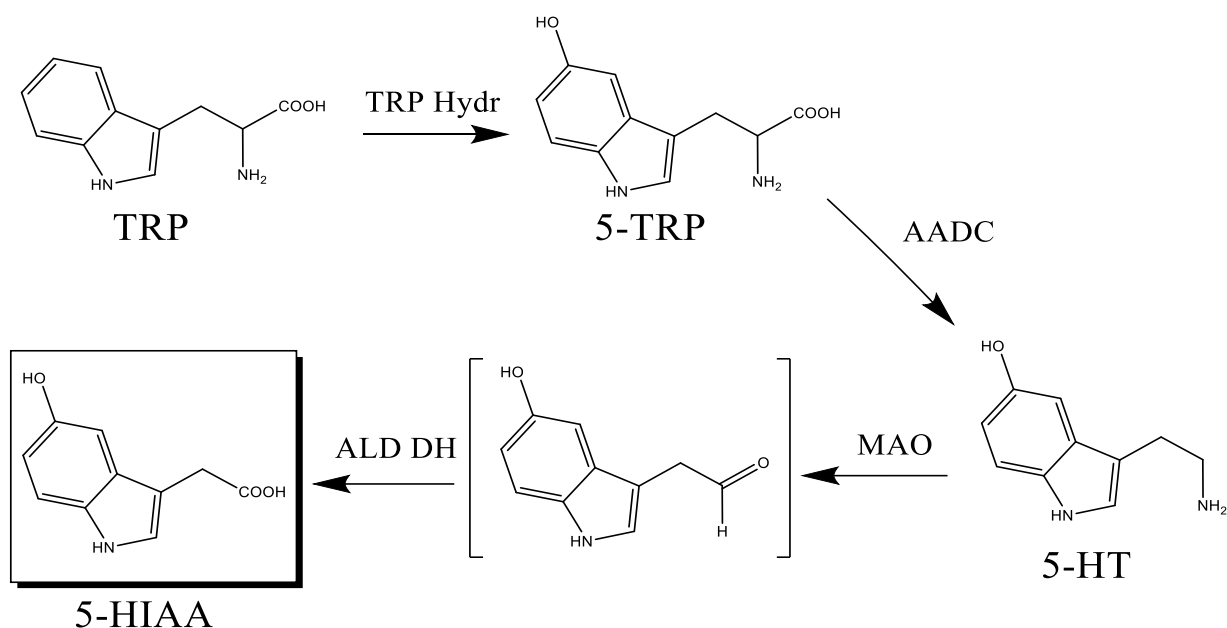
Přibližně u 10 až 50% pacientů s karcinoidními tumory se může vyvinout karcinoidní syndrom, který se projevuje červenáním, průjmem, břišními křečemi, hepatomegalií a výjimečně sípáním a pelagrou [10, 13]. První volbou léčby příznaků karcinoidního syndromu jsou analoga somatostatinu a interferony, doplňkově se může použít i telotristat etiprate [14]. Telotristat etiprate blokuje syntézu serotoninu, který se nadměrně produkuje karcinoidními tumory. Mechanismem blokace je inhibice enzymu tryptofanhydroxylasy, který serotonin produkuje z tryptofanu [15].

Kromě karcinoidních tumorů může být detekce 5-HIAA užitečná při diagnostice neuroblastomu, ale také nemocí s jinou než onkologickou povahou, jako například primární hypertenze, deprese, migréna, nebo Touretteův syndrom [16].

1.3.1. Hlavní metabolická dráha

Z potravy získaný L-tryptofan je pomocí enzymu tryptofanhydroxylasa hydroxylován na 5-hydroxytryptofan a dále metabolizován pomocí dopadekarboxylasy na 5-hydroxytryptamin čili serotonin [17].

Serotonin je po svém vzniku metabolizován především v plicích a játrech pomocí enzymatické konverze monoaminoxidázy přes 5-hydroxyindolacetaldehyd na svůj nejhojnější metabolit 5-hydroxyindolactovou kyselinu pomocí aldehyddehydrogenasy (Obr. 1). 5-hydroxyindolactová kyselina je jako konečný metabolit vyloučena močí. Proto její kvantifikace v moči je velmi důležitá v diagnostice a vyšetření karcinoidních pacientů [18, 19].



Obr.1: Hlavní větev metabolické dráhy tryptofanu. Substráty: L-tryptofan (TRP); 5 hydroxytryptofan (5-HTP); 5-hydroxytryptamin čili serotonin (5-HT); 5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA); Enzymy: tryptofanhydroxylasa (TRP Hydr); dopadekarboxylasa (AADC); monoaminoxidasa (MAO); aldehyddehydrogenasa (ALD DH).

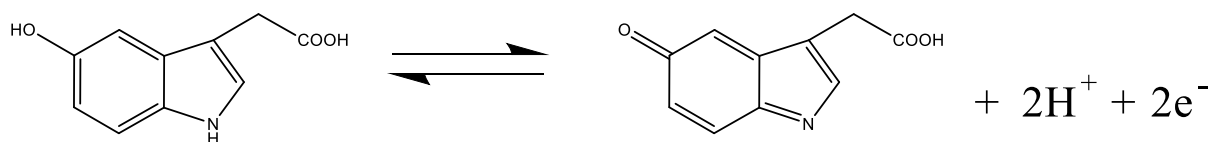
1.3.2. Klinické stanovení 5-HIAA v moči

K rutinní analýze 5-HIAA se v minulosti využívala například fluorimetrie, RIA (z angl. „radioimmunoassay“), a po vhodné derivatizaci kolorimetrie [20]. Derivatizační reakce vedoucí ke vzniku barevných produktů však bývají nespecifické, protože spolu s 5-HIAA ve vzorku reagují i další strukturně podobné látky [21]. Dnes se ke stanovení 5-HIAA v moči používají především plynová nebo kapalinová chromatografie, u kterých jsou tradiční detekční metody nahrazované hmotnostní spektrometrií, přičemž většinou je nutno zbavovat vzorky interferentů. Při použití plynové chromatografie je navíc nutná derivatizace 5-HIAA, což zvyšuje časovou náročnost [13]. Přehled detekčních limitů vybraných metod je shrnutý v tabulce (Tab.1).

Tab. 1 Přehled vybraných metod stanovení 5-HIAA s mezemi detekce

Metoda	LOD	ref
fluorimetrická detekce	1 nmol/l	[22]
MS detekce (trojitý kvadrupól)	5 nmol/l	[23]
CZE-UV detekce	5 nmol/l	[24]
elektrochemická detekce (skelný uhlík)	6,2 nmol/l	[25]
elektrochemická detekce (screen printed carbon electrode)	120 nmol/l	[16]
chemiluminescenční detekce (reakce 5-HIAA s 6-aminomethyl-ftalhydrazidem)	0,2 nmol/l	[26]

Díky její struktuře lze 5-HIAA stanovovat i elektrochemicky, přičemž se předpokládá, že se oxiduje její hydroxylová skupina (Obr. 2) [17]. Elektrochemické stanovení bylo úspěšně demonstrováno při použití primární elektrody ze skelného uhlíku [25, 27, 28] a „screen-printed“ uhlíkové elektrody [16]. Použití diamantové elektrody doposud publikováno nebylo.



Obr. 2 Elektrochemická oxidace 5-hydroxyindolactové kyseliny v moči

Klinické laboratoře užívají obdobných úprav vzorku, které předchází stanovení, kdy je 5-HIAA vyšetřována po 3 denní dietě, která neobsahuje potraviny či léky, které by falešně

zvyšovaly hladinu serotoninu. Moč se sbírá do plastové nádoby obsahující 10 ml 12,5% kyseliny chlorovodíkové po dobu 24 hodin a uvádí se celková diuréza. V průběhu sběru je nutné uchovávat moč v chladu při teplotě 2-15°C a v temnu [29, 30]. Význam dosažených hodnot shrnuje tabulka (Tab.2). Je ale nutno poznamenat, že mnoho laboratoří uvádí horní limit 6 mg za 24 hodin (31,4 $\mu\text{mol}/\text{den}$), některé ale uvádí horní limit 10 mg/den (52,4 $\mu\text{mol}/\text{den}$) nebo dokonce 15 mg/den (78,5 $\mu\text{mol}/\text{den}$) [31].

Tab. 2 referenční hodnoty pro 5-HIAA užívané v České republice

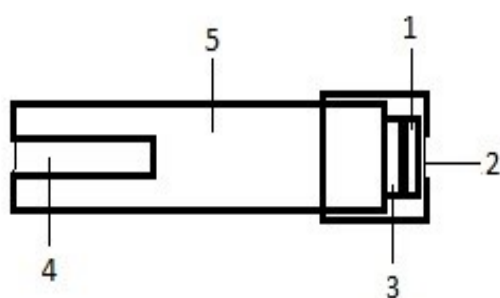
Rozsah	význam
10 - 50 $\mu\text{mol}/\text{den}$	v normě
50 - 80 $\mu\text{mol}/\text{den}$	málo průkazné
80 - 130 $\mu\text{mol}/\text{den}$	nejednoznačně patologické
>130 $\mu\text{mol}/\text{den}$	jasně patologické (cut off)

1.4. Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

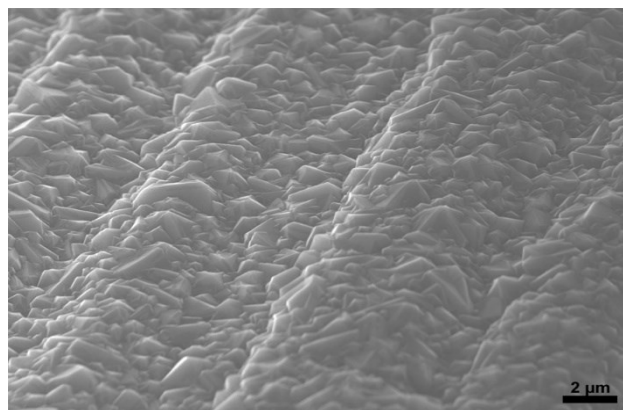
Borem dopovaný diamantový film (BDDF) je elektrodový materiál známý od osmdesátých let dvacátého století [32]. BDDF elektroda patří do skupiny uhlíkových elektrod [33], vykazuje však výrazně odlišné vlastnosti, než například elektroda ze skelného uhlíku nebo grafitu [34]. Jeho hlavní výhodou je široké potenciálové okno, které může dosahovat hodnot kolem 3,5 V v závislosti na kvalitě filmu a obsahu nečistot. Tak široké potenciálové okno většina elektrodových materiálů nedosahuje, tím pádem je s ním možné studovat i analyty, které běžnými elektrodami studovat nelze. Mezi další výhody tohoto materiálu patří nízký zbytkový proud a mechanická a chemická odolnost [35]. Z toho plyne vysoká tolerance k širokému spektru různých rozpouštědel [33]. Kromě běžně používaných BDDF elektrod byla publikována i příprava miniaturní, tzv. ultramikroelektrody s BDD filmem, která umožňuje měření ve velmi malém prostoru na cílových místech a zároveň si zachovává výhody BDDF elektrody [36].

1.4.1. Příprava borem dopovaných diamantových elektrod

V současné době existuje minimálně šest dodavatelů těchto elektrod, ale mnoho vědeckých laboratoří si diamantové filmy pořád vyrábí z vlastních zdrojů [37]. Diamantové filmy se obvykle deponují pomocí metody chemické depozice par. Plyná reakční směs se převážně skládá z vodíku s příměsí plynu obsahujícího uhlík (například methanu), jehož koncentrace dosahuje řádově jednotky procent [38]. Pro dosažení vodivosti deponované vrstvy se do plynné fáze přidává nečistota, v případě BDD elektrody se jedná o sloučeninu boru (například diboran [39], trimethylbor [40], nebo trimethylester kyseliny borité [41]). Plyná směs se následně aktivuje, a to buď termicky (vyhříváním kovovým vláknem), nebo elektrickým výbojem [38]. Substrátem, na kterém film roste, může být kov (W [39], Nb [41], Ta [42]...), křemík [40], anebo grafit, v případě grafitu však byla demonstrována nerovnoměrná aktivita a nedostatečná mechanická pevnost dopované vrstvy [43]. Substráty se při procesu depozice vyhřívají na teplotu kolem 850 °C a k spuštění krystalizace se používají nano- a mikrokristaly diamantu [38]. Plocha deponovaného filmu může dosáhnout až několik cm². Vzniklé filmy jsou polykrystalické s krystaly o velikosti 0,5 - 3 μm (Obr. 3) [32].



A



B

Obr. 3 **A:** Schéma borem dopované diamantové filmové elektrody (1) substrát s deponovaným diamantovým filmem, (2) měrná plocha, (3) kovová plocha zajišťující kontakt, (4) vodič, (5) tetřlonové tělo; **B:** Fotografie povrchu elektrody pod elektronovým mikroskopem.

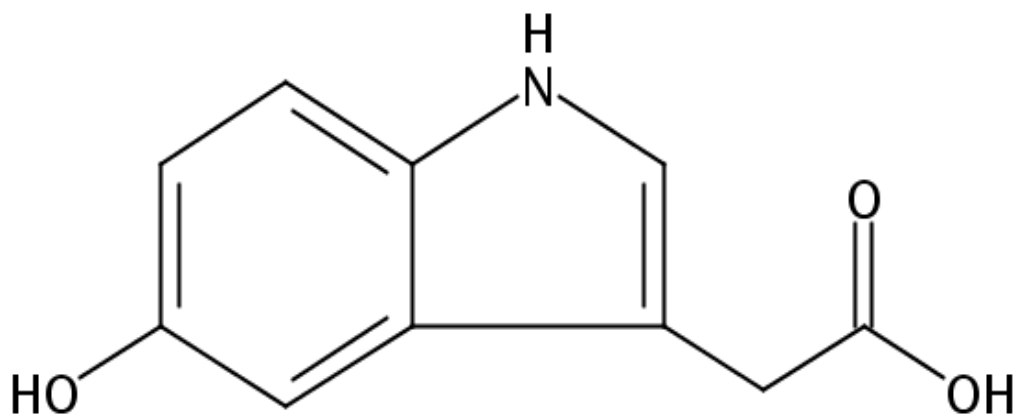
1.4.2. Využití borem dopovaných diamantových filmových elektrod

Kromě využití borem dopovaných diamantových elektrod ke studiu elektrochemických reakcí a stanovení analytů v analytické chemii nalézají uplatnění i v jiných oblastech. Používají se například k odstraňování organických polutantů z odpadních vod [44]. V závislosti na vloženém napětí se organické molekuly oxidují buď generovanými hydroxylovými radikály z vody, nebo přímým přenosem elektronů. Mezi látky, které lze tímto způsobem odstranit patří například fenoly, triaziny, kyanidy či herbicidy [45].

Jednou z dalších oblastí využití borem dopovaných diamantových elektrod je elektrochemická syntéza, která představuje alternativu k tradiční syntéze využívající chemické reakce. Ve srovnání s ní má několik předností. Jednu z nich představuje provedení selektivní reakce bez použití chránicí skupiny, a to prostřednictvím kontroly vkládaného napětí, nebo využití různé afinity funkčních skupin k povrchu elektrody. Další výhodou je nižší spotřeba vysoce reaktivních činidel kvůli využití elektrické energie k provádění samotných reakcí. Možnosti elektrochemické syntézy organických látek na borem dopovaných diamantových elektrodách shrnuje referát [46].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Studovaná látka



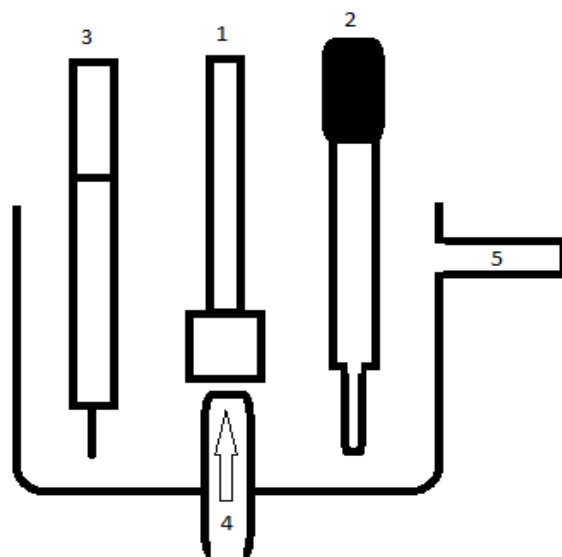
Obr. 4 Molekula 5-HIAA

Systematické název:	1 <i>H</i> -Indole-3-acetic acid, 5-hydroxy- (Obr.4)
Triviální název:	5-Hydroxyindoloctová kyselina
Sumární vzorec:	C ₁₀ H ₉ NO ₃
CAS RN:	54-16-0
Molekulová hmotnost:	191,18 g.mol ⁻¹
pKa:	4,54±0,30 (25 °C)
Teplota tání:	161-164 °C (Experimentální)
Teplota varu:	497,1±30,0 °C (Tlak: 760 Torr)
Vlastnosti:	Bílá až lehce nafialovělá krystalická látka (bez zápachu) dobře rozpustná ve vodě, citlivá na světlo.
Čistota:	≥ 98% (HPLC)
Uchování:	V temnu a chladu (-20 °C)
Výrobce:	Sigma-Aldrich

2.2. Použitá aparatura a metody

2.2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vzhledem k povaze studované látky byla použita chromatografie na reverzních fázích RP-HPLC, kde stacionární fází byl nepolární oktadecyl chemicky vázaný na silikagelu a mobilní fází byl polární methanol pro HPLC (Lach-ner, Neratovice, ČR) ve směsi s acetátosfátovým puftrem. Hlavní separační kolona (LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5µm), Merck, Německo) s náplní C18, délkou 25 cm a velikostí částic o průměru 5 µm byla chráněna předkolonkou (LiChroCART 4-4, Merck, Německo). Průtok mobilní fáze zajišťovala vysokotlaká gradientová pumpa (Beta 10, Ecom spol s.r.o., Praha, ČR) a její odvzdušnění vakuový degasser (DG 3014, Ecom spol s.r.o., Praha, ČR). Nástřik do HPLC kolony se prováděl pomocí 3ml injekční stříkačky do dávkovacího ventilu (sample injektor D UNI, Ecom spol s.r.o., Praha, ČR) se smyčkou o objemu 20 µl. Chromatografický systém byl vybaven dvěma detektory zapojenými v serii. UV detektor (Sapphire 600, Ecom spol s.r.o., Praha, ČR) pracoval při konstantní vlnové délce 276 nm, tedy v jednom z absorpčních maxim stanovované látky. Amperometrický detektor (ADLC 1, Laboratorní přístroje, Praha, ČR) v uspořádání wall-jet (Obr. 5) pracoval ve tříelektrodovém uspořádání s pracovní borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou (NeoCoat SA, Švýcarsko), referenční argentchloridovou elektrodou s 3 mol·l⁻¹ KCl (ETP CZ R 006-05, Monokrystaly, ČR) a pomocnou platinovou elektrodou (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).



Obr. 5 Elektrochemická cela detektoru v provedení wall-jet, (1) pracovní elektroda, (2) referenční elektroda, (3) pomocná elektroda, (4) vstup a směr proudění mobilní fáze, (5) přepad.

2.2.2. Další zařízení

Analytické váhy:	Sartorius 2004 MP (Sartalex, Česká republika)
Spektrofotometr:	Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometer (USA), měřeno v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm.
pH metr:	digitální měřicí přístroj Conductivity and pH metr 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou
Magnetická míchačka:	MS 3000 (Biosan,USA)
Ultrazvuk:	ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

2.3. Pracovní postupy a reagentie

2.3.1. Stanovení HPLC s UV a ED detekcí

Pro optimalizaci metody se používal standard 5-HIAA o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Rychlost průtoku byla $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Při nástřiku vzorku matrice se za injekční stříkačku nasazoval nylonový filtr (Fisher Scientific) velikosti 13 mm s póry velikosti $0,45 \mu\text{l}$, aby nedocházelo k zanesení kolony. V průběhu celého měření zůstal rozsah citlivosti amperometrického detektoru na $1 \mu\text{A/V}$. Vyhodnocovací program (Clarity 2.3, Data Apex, ČR, pracující v prostředí Windows 7, Microsoft) zaznamenával vždy tři po sobě jdoucí měření jednoho parametru, z nichž byl stanoven průměr.

2.3.2. Charakterizace pracovní elektrody - Aktivace BDDFE

Na začátku dne před měřením bylo nutno povrch elektrody aktivovat. Byl navržen postup účinné aktivace ve vodném roztoku $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny sírové (96 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Za stálého míchání se ve voltametrické cele (Eco Tribo Polarograph, Polaro-Sensors, Praha, ČR) střídavě vkládal potenciál $+3000 \text{ mV}$ a -3000 mV , každý po dobu 30 sekund, a to celkem dvacetkrát. Následovalo otestování funkčnosti elektrody, to se provádělo v $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku hexakynoželezitanu draselného jakožto modelového redoxního systému s $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ chloridem draselným jako základním elektrolytem, pomocí cyklické voltametrie při parametrech: počáteční potenciál: -200 mV ; konečný potenciál: 1200 mV ; rychlost scanu: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Z výsledného voltamogramu byl odečten potenciál katodického a anodického píku. Pakliže byl rozdíl nejvýše 200 mV , elektroda byla připravena k měření. V opačném případě byl postup aktivace opakován. Na konci dne nebo po delší době nečinnosti elektrody byl povrch elektrody očištěn acetonitrilem (pro HPLC, Fisher Chemical, USA) v ultrazvukové čističce. Data zpracovával vyhodnocovací software (PolarPro verze 5.1, Polaro-Sensors, Praha, ČR pracující v prostředí Windows XP, Microsoft).

2.3.3. Příprava roztoků

Zásobní roztok 5-hydroxyindoloctové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven navážením přesného množství pevného standardu a posléze kvantitativním přesunutím a rozpuštěním navážky v odměrné baňce deionizovanou vodou (Millipore, USA).

Zásobní roztok 5-hydroxyindoloctové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven desetinasobným zředěním zásobního roztoku 5-HIAA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pomocí automatické pipety a odměrné baňky. Obdobným způsobem byly připravovány koncentrace pro kalibrační závislost v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Připravené roztoky 5-HIAA byly uchovávány v lednici při teplotě 5°C .

Acetáto-fosfátový pufr o žádaném pH byl připraven pomocí pH-metru smíšením kyselé a zásadité složky. Kyselá složka o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla připravena v 1l odměrné baňce smísením kyseliny *o*-fosforečné (85 %, p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR) s kyselinou octovou (99,8 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a doplněním deionizovanou vodou na požadovaný objem. Zásaditou složkou byl $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok hydroxidu draselného připravený z pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR).

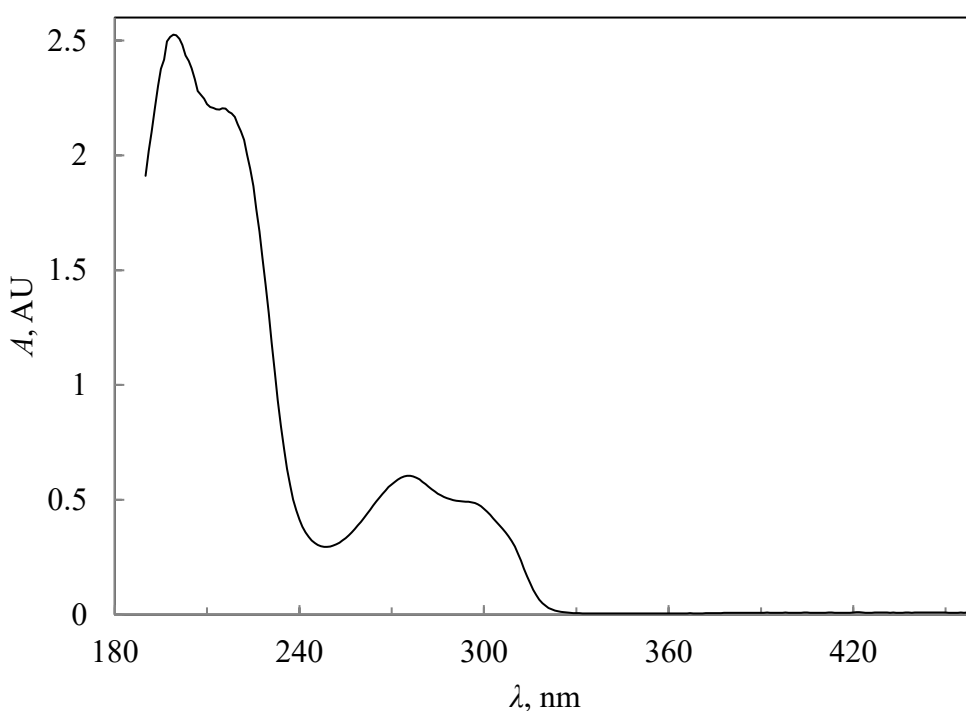
Roztok $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hexakynoželeznanu draselného (p.a., Lachema, Neratovice, ČR) v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ chloridu draselném (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) byl připraven navážením přesného množství pevných standardů a posléze kvantitativním přesunutím a rozpuštěním navážek v odměrné baňce deionizovanou vodou.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Studium stálosti zásobního roztoku 5-HIAA

Stálost zásobního roztoku standardu 5-HIAA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla sledována spektrofotometricky po dobu sta dnů. Měřeno bylo UV-VIS spektrum v rozsahu vlnových délek 190-700 nm na 1 mm křemenné kyvetě a jako blank sloužila deionizovaná voda. Z absorpčního spektra (Obr. 6) jsou patrná dvě absorpční maxima pouze v UV oblasti a to při vlnové délce 200 nm a sledované 276 nm. Vyšší vlnová délka zvyšuje selektivitu stanovení, proto byla vybrána.

Z výsledných hodnot absorpance vyplývá (Tab. 3), že v průběhu skladování ve tmě a chladu při teplotě 5°C koncentrace roztoku standardu postupně mírně klesá. i tak ale můžeme konstatovat, že látka je po dobu tří měsíců stálá. Delší skladování se ale nedoporučuje.



Obr. 6 UV-VIS absorpční spektrum 5-HIAA o $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; křemenná kyveta tloušťky 1 mm, blank: deionizovaná voda.

Tab. 3 Stálost zásobního roztoku 5-HIAA o $c=1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyjádřená procentuálním úbytkem absorbance při $\lambda=276 \text{ nm}$, blank: deionizovaná voda.

dny (t)	$\lambda=276 \text{ nm}$	
	A, AU	%
0	0.70174	100
1	0.70118	99.9
6	0.7008	99.9
16	0.70037	99.8
31	0.69928	99.6
59	0.69732	99.4
100	0.69421	98.9

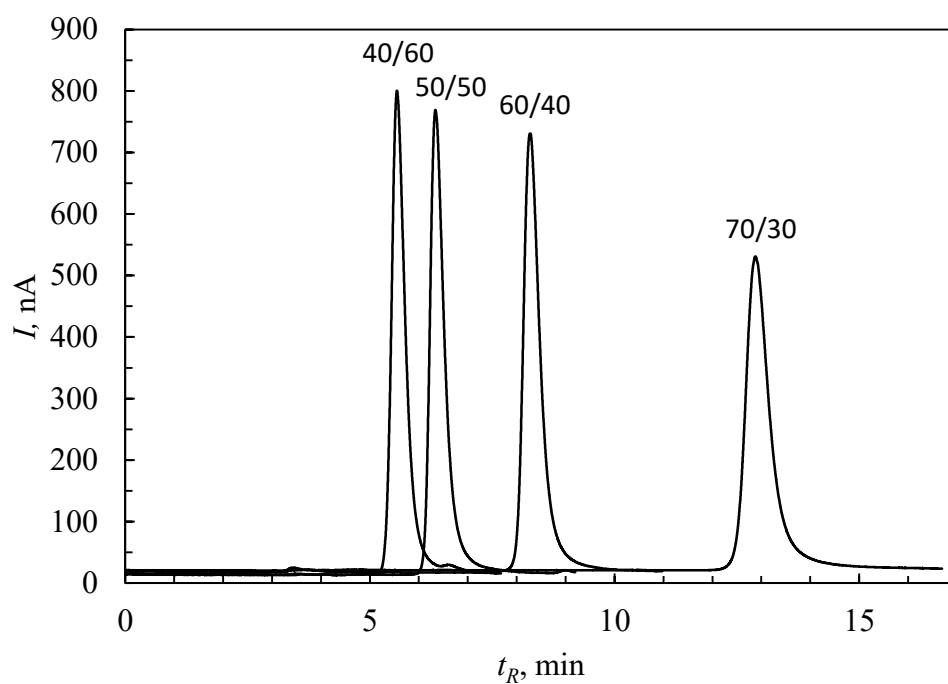
3.2. Optimalizace metody

3.2.1. Poměr obsahu metanolu v mobilní fázi

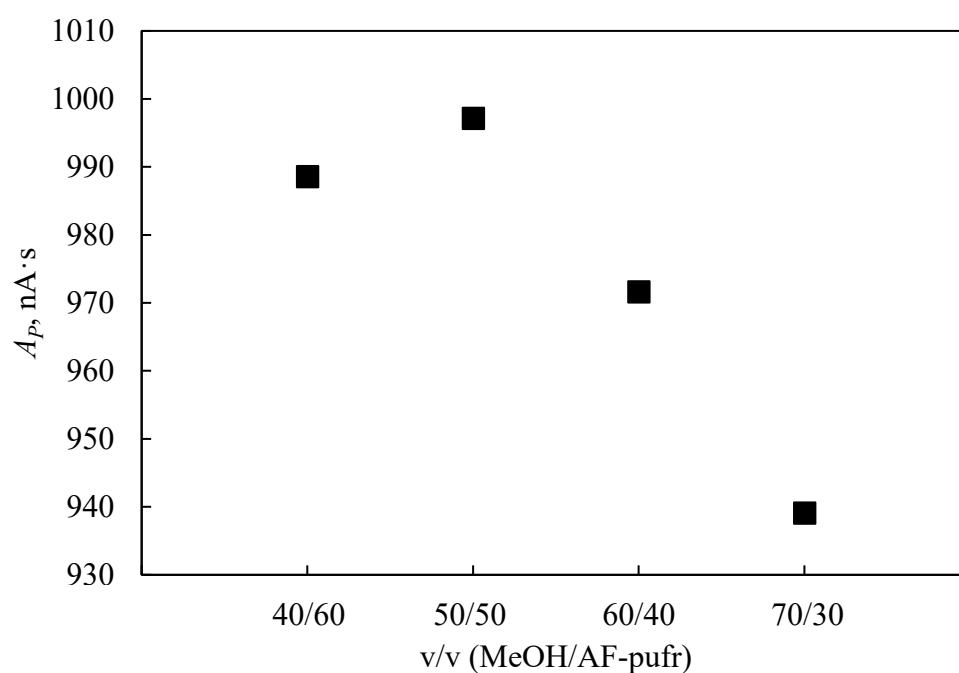
Prvním krokem optimalizace bylo nalezení správného poměru organické a vodné složky v mobilní fázi. Kromě volby kolony má složení mobilní fáze a její polarita velký význam při separaci analytu a je dobré znát případné chování analytu před jeho stanovením v tak komplexní matici jakou je moč. Metodou isokratocké eluce bylo provedeno měření pro čtyři různé poměry metanolu ku acetátosvátovému pufru o $\text{pH}=3$ a to 60/40, 50/50, 40/60, 30/70 (v/v).

Z chromatogramů je patrné, že se zvyšujícím se obsahem vodné složky v mobilní fázi a klesající polaritou danou organickým modifikátorem methanolem zůstává analyt déle zadržován na koloně a zvyšuje se jeho retenční čas. S přibývajícím časem se výsledný pík více rozmývá. Oproti předpokladu však nestoupá plocha píku, i když se prodlužuje kontakt analytu s povrchem elektrody, a plocha píku s klesajícím obsahem metanolu mírně klesá (Obr. 8).

S ohledem na retenční čas a největší odezvu detektoru (Obr. 7) byl vybrán poměr 50/50 (v/v), pro účely optimalizace je za těchto podmínek možno očekávat eluci látky přibližně v čase 6,20 min (Tab. 4).



Obr. 7 Chromatogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ 5-HIAA v prostředí methanolu a AF-pufru o pH 3,0 v poměrech: 40/60; 50/50; 60/40; 70/30 (v/v), pracovní elektroda BDDFE, $E_{\text{prac}} = 1,1 \text{ V}$, $F = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$)



Obr. 8 Závislost plochy piku 5-HIAA o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ na poměru MeOH ku AF-pufru v mobilní fázi.

Tab. 4 Hodnoty retenčních časů pro různé poměry mobilní fáze.

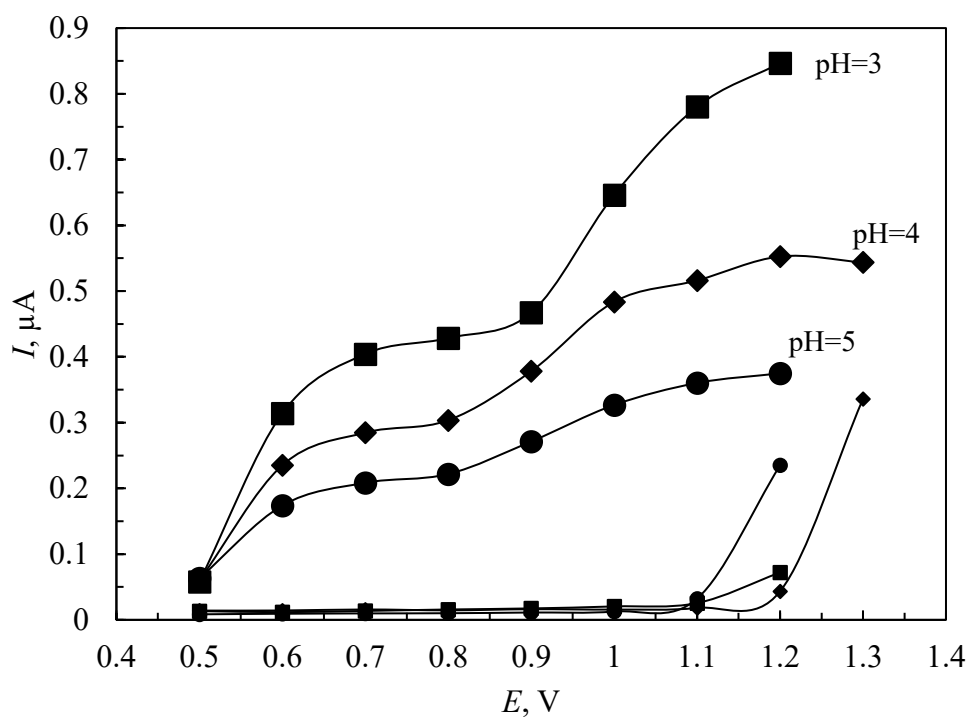
Poměr AF-pufr/MeOH (v/v)	t_R , min
40/60	5.4
50/50	6.18
60/40	8.11
70/30	12.71

3.2.2. Závislost signálu na pH prostředí a potenciálu pracovní elektrody

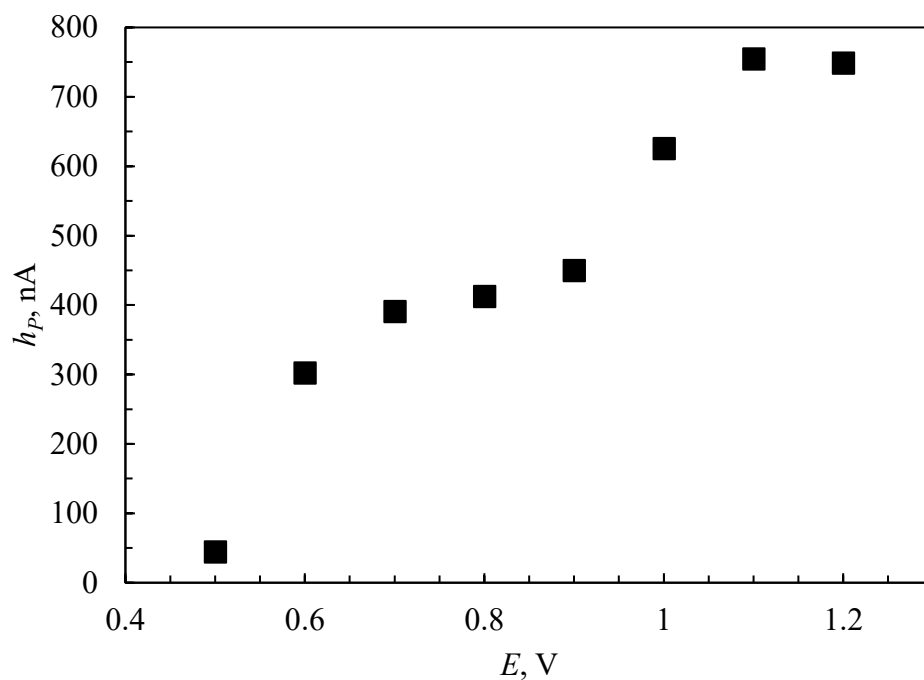
Důležitým krokem při vývoji metody je nalezení optimálního pH AF-pufru a optimálního potenciálu pracovní elektrody. K tomu byly sestrojeny hydrodynamické voltamogramy, které sledují závislost výšky píku na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu při určitém pH mobilní fáze. Dále na základě předchozích zkušeností [16, 20] byla prozkoumána oblast pH AF-pufru 3,4 a 5; tento rozsah pH se pohybuje okolo hodnoty disociační konstanty 5-HIAA, která činí $pK_A = 4,5$. S ohledem na použitý typ kolony je vyloučeno alkalické pH. Z hlediska potenciálu pracovní elektrody byly proměřeny hodnoty v rozmezí +0,5 až +1,3 V s krokem po 0,1 V.

Z naměřených hodnot (Obr. 9) se jako nejvhodnější prostředí jeví pH AF-pufru 3. V tomto pH je dosaženo nejvyšších signálů v celém zkoumaném potenciálovém rozmezí z čehož plyne, že protonizace analytu má pozitivní vliv na odezvu detektoru. Se stoupajícím pH odezva klesá.

Pro zvolení optimálního potenciálu pracovní elektrody byla sestrojena závislost výšky píku na potenciálu po odečtení pozadí (Obr.10). Na hydrodynamickém voltamogramu můžeme pozorovat dvě vlny nárůstu potenciálu. První se objevuje od potenciálu 0,6 V do potenciálu 0,8 V, druhý, mnohem strmější nárůst signálu nastává od potenciálu 0,9 V, kde pozorujeme kontinuální nárůst proudu až do maxima při potenciálu 1,1 V. Při vyšších potenciálech následoval výrazný unik základní linie daný koncem potenciálového okna základního elektrolytu. Pro další měření byl tedy zvolen potenciál pracovní elektrody 1,1 V. Se stoupajícím potenciálem rostla doba potřebná k ustálení základní linie na počátku měření.



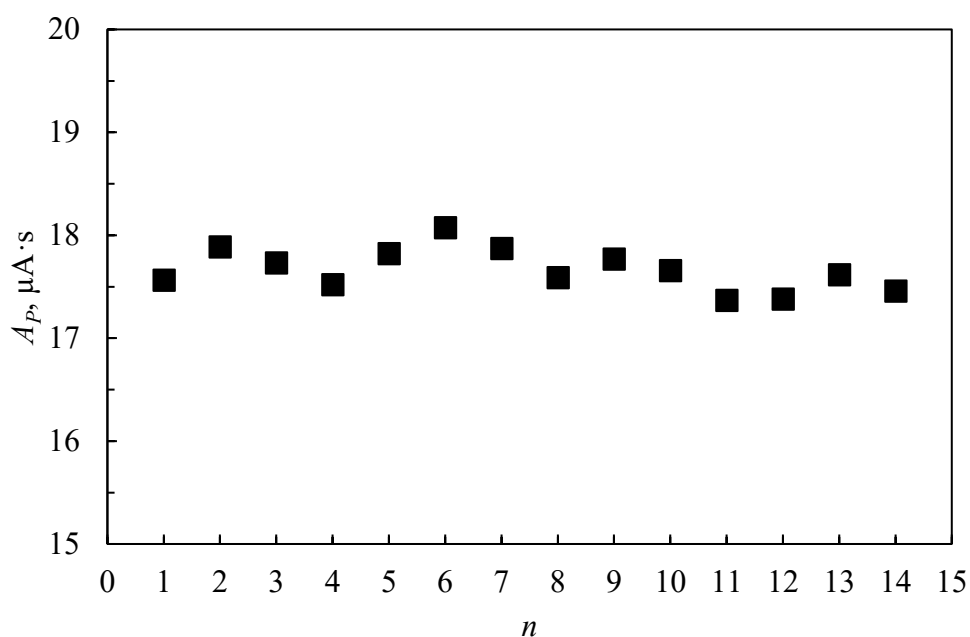
Obr. 9 Hydrodynamický voltamogram $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ 5-HIAA na BDDFE v prostředí methanolu a AF-pufry o pH 3,0; 4,0; 5,0 (50/50, v/v), $F=0,5 \text{ ml.min}^{-1}$



Obr.10 Závislost míry odezvy $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ 5-HIAA po odečtení pozadí na vloženém potenciálu, pH 3,0

3.2.3. Opakovatelnost měření

Při elektrooxidaci analytu může v průběhu měření docházet k adsorpci produktů této elektrodové reakce na povrchu pracovní elektrody, čímž se elektrodový materiál pasivuje. K určení změny elektrochemických vlastností pracovní elektrody v čase byla elektroda zatížena sérií 14 identických nástříků vzorku 5-HIAA ve dvouminutových intervalech, při doposud zjištěných optimálních podmínkách. Odečtené hodnoty z chromatogramů byly vyneseny do grafu (Obr.11) a výsledky z měření výšek i ploch píků byly statisticky zpracovány (Tab. 4). Je možno sledovat stabilní chování, kdy mezi prvním a posledním měření došlo k poklesu signálu pouze o 0,6 %. Relativní směrodatná odchylka z ploch píků je nízká, $s_r = 1,1 \%$ avšak u vyhodnocení výšek píku je relativní směrodatná odchylka až 6,6 %. V tomto počtu nástříků a časovém horizontu přibližně 30 min se neprojevila výrazná pasivace elektrody.



Obr.11 Závislost plochy píku na počtu měření, pracovní elektroda BDDFE, $E_{prac} = 1,1 \text{ V}$, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0 (50/50, v/v), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μm), $F=0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 4 Statistické vyhodnocení měření opakovatelnosti pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-HIAA při 14 opakováních

	$A_P, \mu\text{A} \cdot \text{s}$	h_P, nA
Průměr	17.67	640
s	0.20	42.1
$s_r, \%$	1.1	6.6

3.3. Kalibrační závislost

Kalibrační závislost roztoku standardu 5-HIAA byla vyšetřena za optimálních podmínek určených předchozím měřením, tedy při isokratické eluci mobilní fáze v poměru 50:50 (v:v) methanolu a AF-pufu o pH 3, na koloně LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$), o průtoku mobilní fáze $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a potenciálu pracovní elektrody 1,1 V. Byla vytvořena koncentrační řada roztoků standardu v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Naměřené hodnoty výšek pík byly zpracovány metodou lineární regrese. Vždy šlo o průměrnou hodnotu tří po sobě jdoucích měření.

3.3.1. Spektrofotometrická detekce

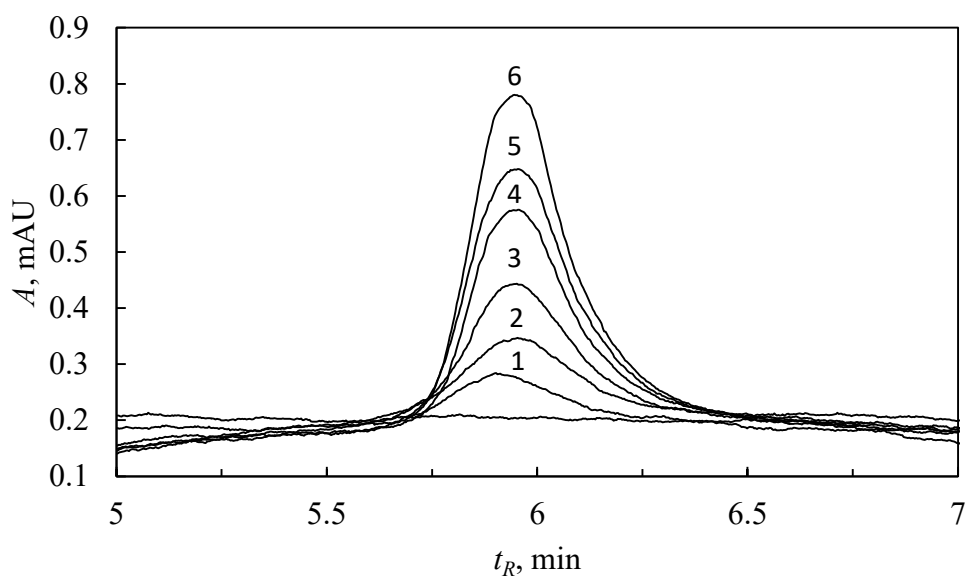
UV spektrofotometrický detektor pracoval při vlnové délce 276 nm. Získané parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v přehledné tabulce (Tab. 5). Na základě těchto údajů byla vypočtena dosažená mez detekce LOD, která byla stanovena jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu a mez stanovitelnosti LOQ, jež odpovídá desetinásobku absolutní hodnoty šumu. Absolutní hodnota šumu byla 0,016 mAU. Pro koncentrační řadu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou chromatogramy uvedeny na Obr.12 a pro $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na Obr.14. K nim přísluší grafy s kalibračními přímkami (Obr.13) a (Obr.15) vyhodnocené z výšek píku a v celém studovaném rozsahu koncentrace (Obr.16); rovněž je uvedena logaritmická forma kalibrační přímky (Obr.17).

Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9993 až 0,9999. Linearitu závislostí potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota je blízká jedné. Limit detekce byl vypočítán na $8,84 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a limit stanovitelnosti na $2,95 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

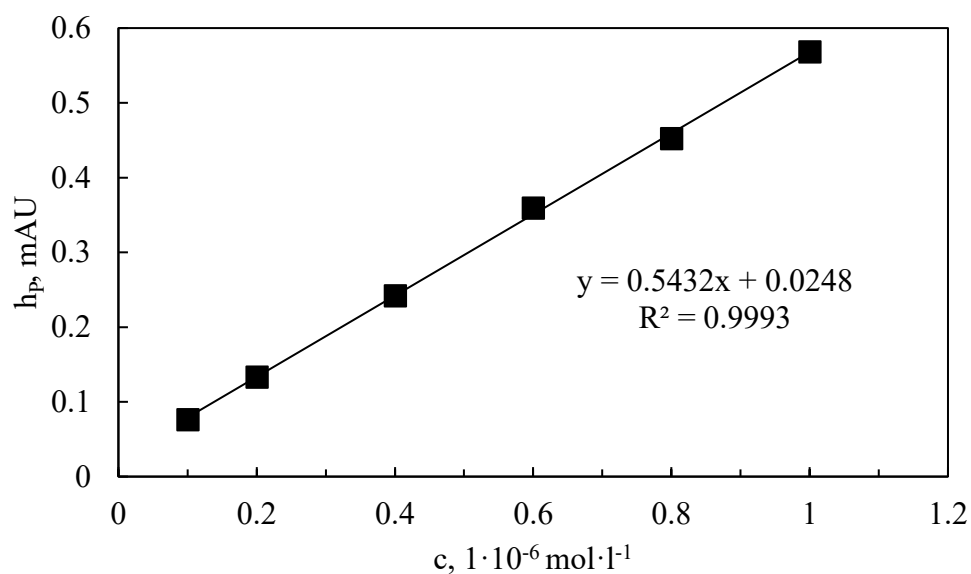
Tab. 5 Parametry kalibračních závislostí 5-HIAA, UV-detekce

c	směrnice	úsek	R^2
$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$\text{mAU}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	mAU	
$1\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	0.6034	0.4310	0.9999
$1\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-5}$	0.5601	0.0398	0.9998
$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-6}$	0.5432	0.0248	0.9993
$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	0.5993	0.1462	0.9999

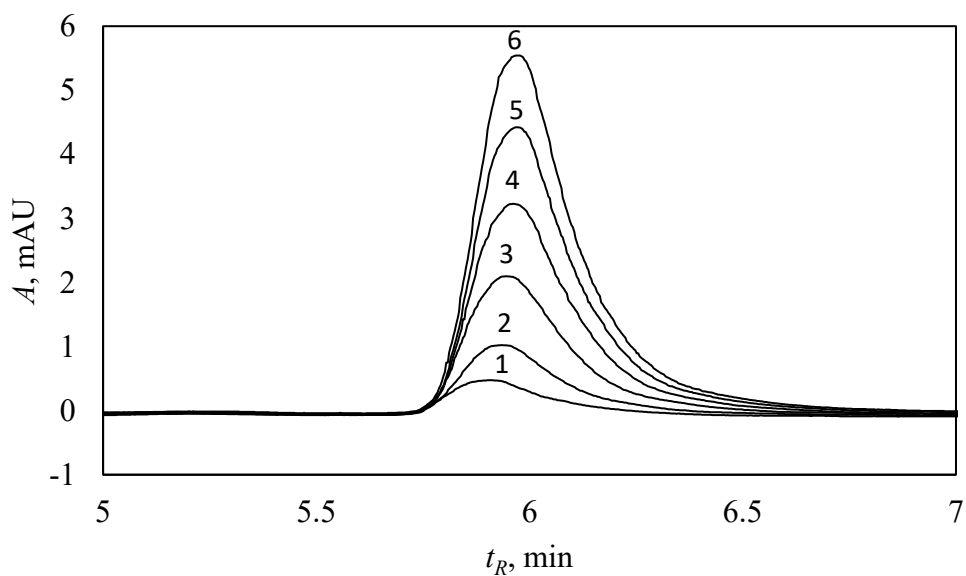
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$, $a=0.9825$; $b=0.2183$; $R^2=0.9987$



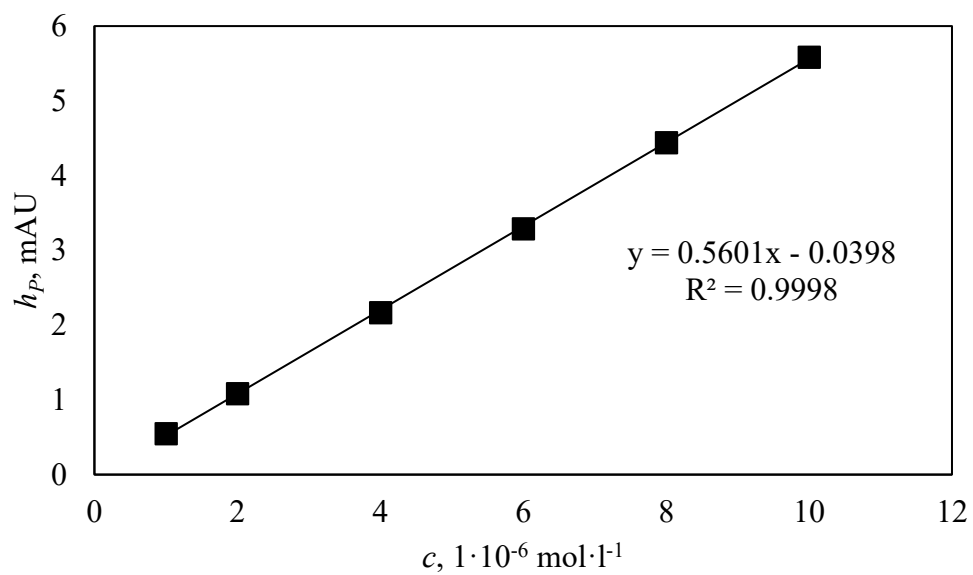
Obr.12 Chromatogramy koncentrační závislosti 5-HIAA, UV-detekce, $\lambda=276\text{ nm}$, v prostředí methanolu a AF-pufry o pH 3,0 (50:50, v/v), Koncentrace $[\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$: $1\cdot 10^{-7}$ (1), $2\cdot 10^{-7}$ (2), $4\cdot 10^{-7}$ (3), $6\cdot 10^{-7}$ (4), $8\cdot 10^{-7}$ (5), $1\cdot 10^{-6}$ (6), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5\mu\text{m}$), F : $0,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$



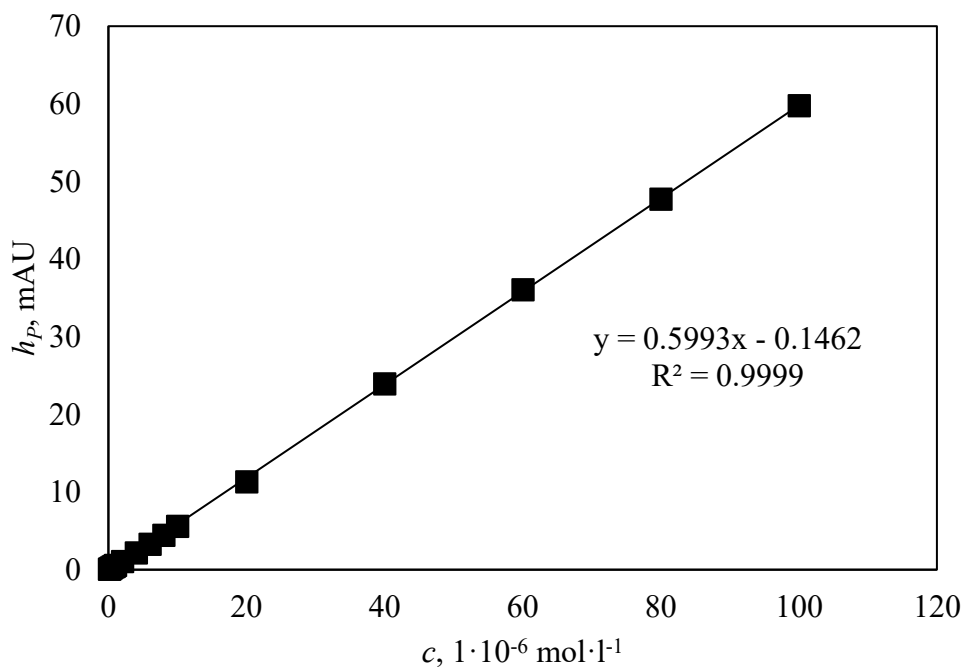
Obr.13 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



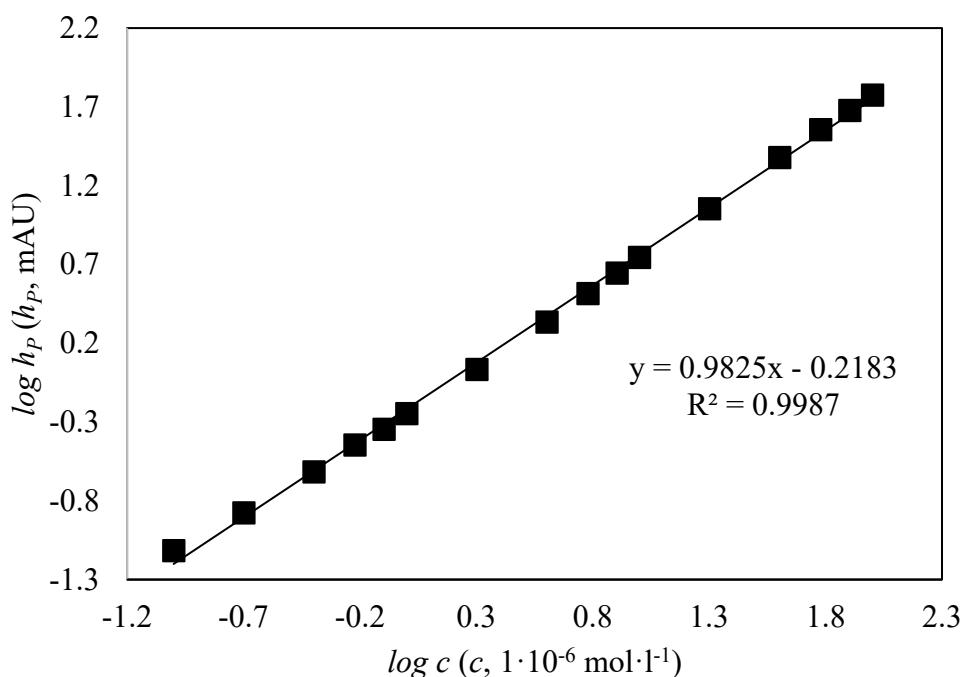
Obr.14 Chromatogramy koncentrační závislosti 5-HIAA, UV-detekce, $\lambda=276 \text{ nm}$, v prostředí methanolu a AF-pufří o pH 3,0 (50:50, v/v), Koncentrace [mol.l^{-1}]: $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$), $F: 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$



Obr.15 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



Obr.16 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



Obr.17 logaritmická závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient

3.3.2. Elektrochemická detekce

Amperometrický detektor pracoval při optimálním potenciálu pracovní elektrody 1,1 V. Získané parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v přehledné tabulce (Tab. 6). Na základě těchto údajů byla vypočtena dosažená mez detekce LOD, která byla stanovena jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu a mez stanovitelnosti LOQ, jež odpovídá desetinásobku absolutní hodnoty šumu. Absolutní hodnota šumu byla 0,344 nA. Pro koncentrační řadu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou chromatogramy uvedeny na Obr.18 a pro $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na Obr.20. K nim přísluší grafy s kalibračními přímkami (Obr.19) a (Obr.21) vyhodnocené z výšek píku a v celém studovaném rozsahu koncentrace (Obr.22); rovněž je zpracována logaritmická forma kalibrační přímky (Obr.23).

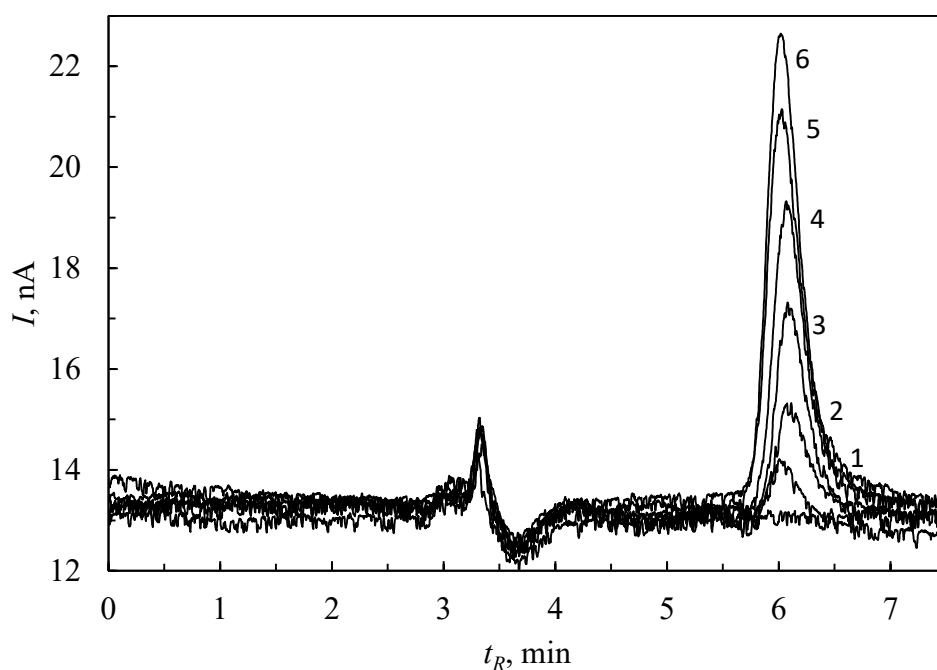
Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9993 až 0,9959. Nižší hodnota koeficientu determinace u nejnižšího koncentračního rozmezí je způsobena šumem v základní linii, to přispívá k chybě při odečítání hodnoty výšky píku. V tomto rozmezí je na chromatogramu patrný i systémový pík, který odpovídá mrtvému času kolony. Linearitu závislostí potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota je blízká jedné. Mez detekce byla vypočítána na

$1,19 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti na $3,96 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Meze detekce i stanovitelnosti jsou obdobné jako u příznivější pro UV detekce a v obou případech vyhovují hodnotám očekávatelným v reálných vzorcích.

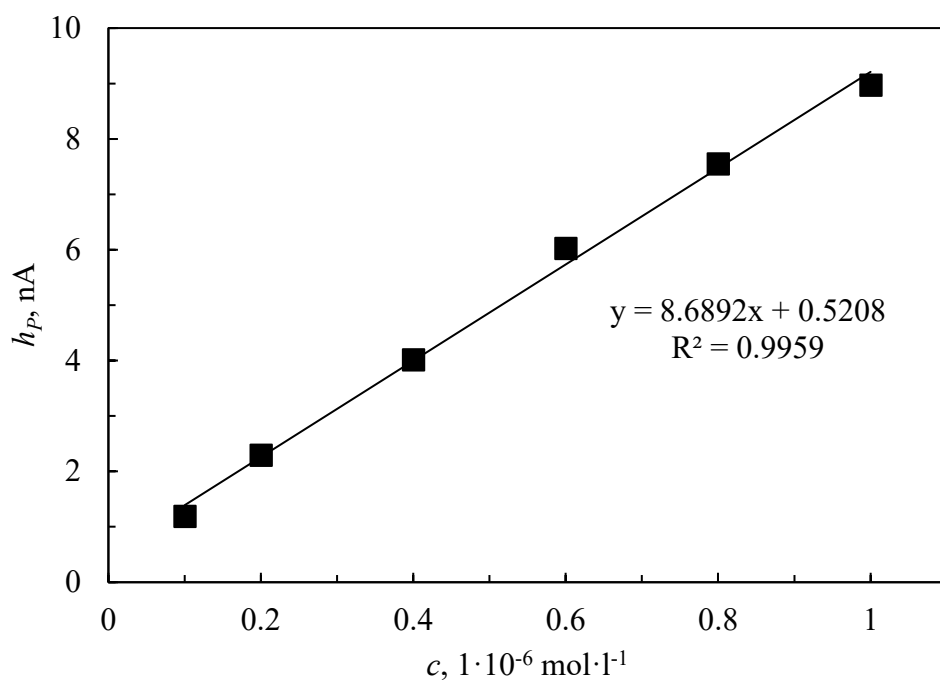
Tab. 6 Parametry kalibračních závislostí 5-HIAA, elektrochemická detekce

c mol.l^{-1}	směrnice $\text{nA} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6.6897	2.3232	0.9993
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	6.3384	1.4087	0.9993
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	8.6892	0.5208	0.9959
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6.7084	0.8770	0.9997

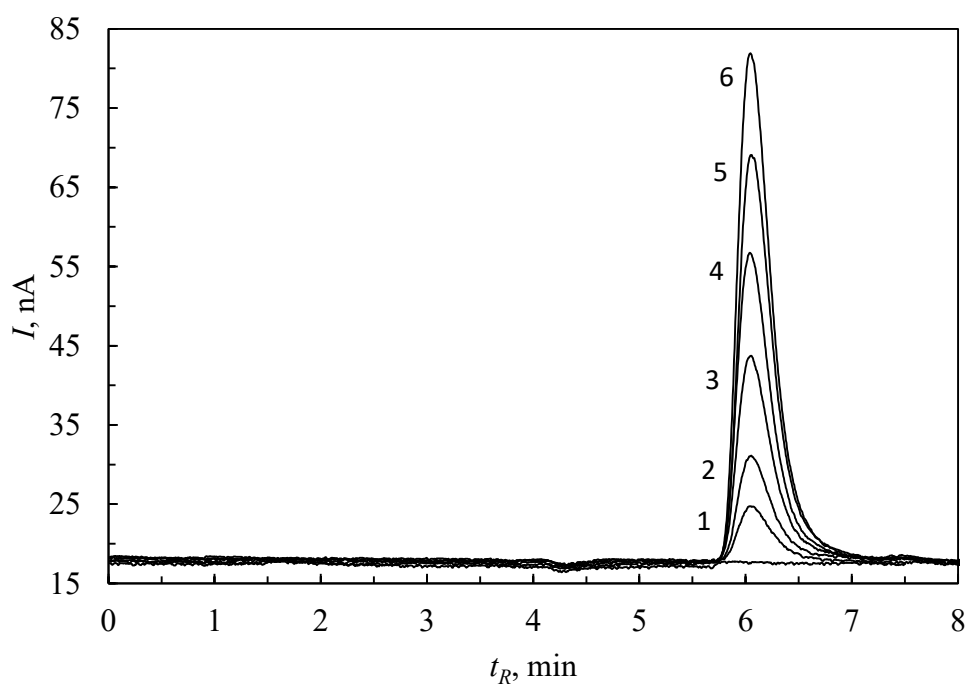
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$, $a=0.9113$; $b=0.9442$; $R^2=0.9966$



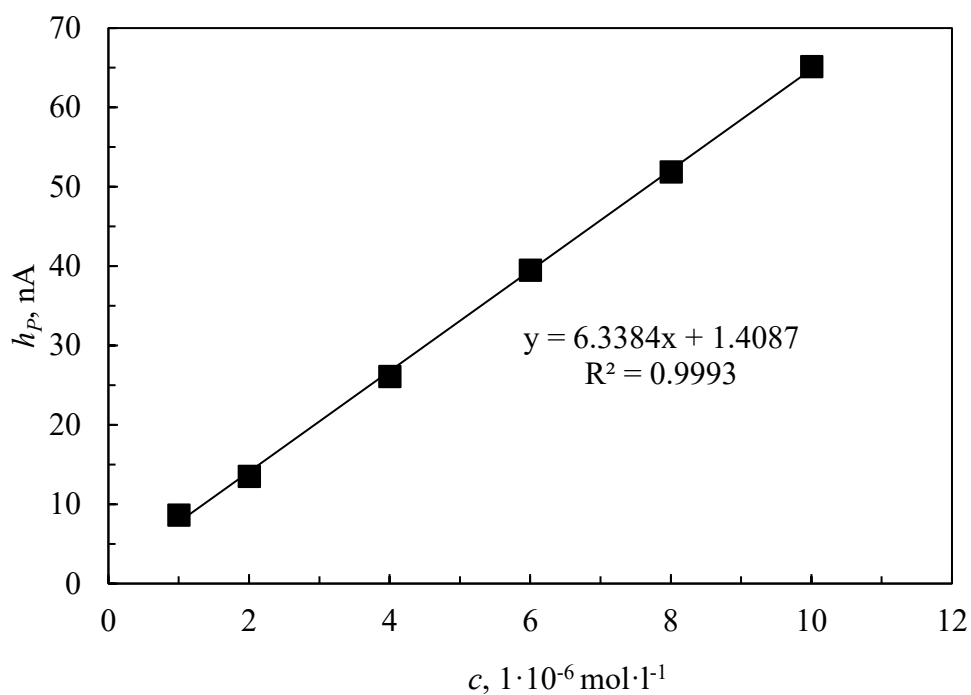
Obr.18 Chromatogramy koncentrační závislosti 5-HIAA, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0 (50:50, v/v), Koncentrace $[\text{mol.l}^{-1}]$: $1 \cdot 10^{-7}$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$), F : $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$



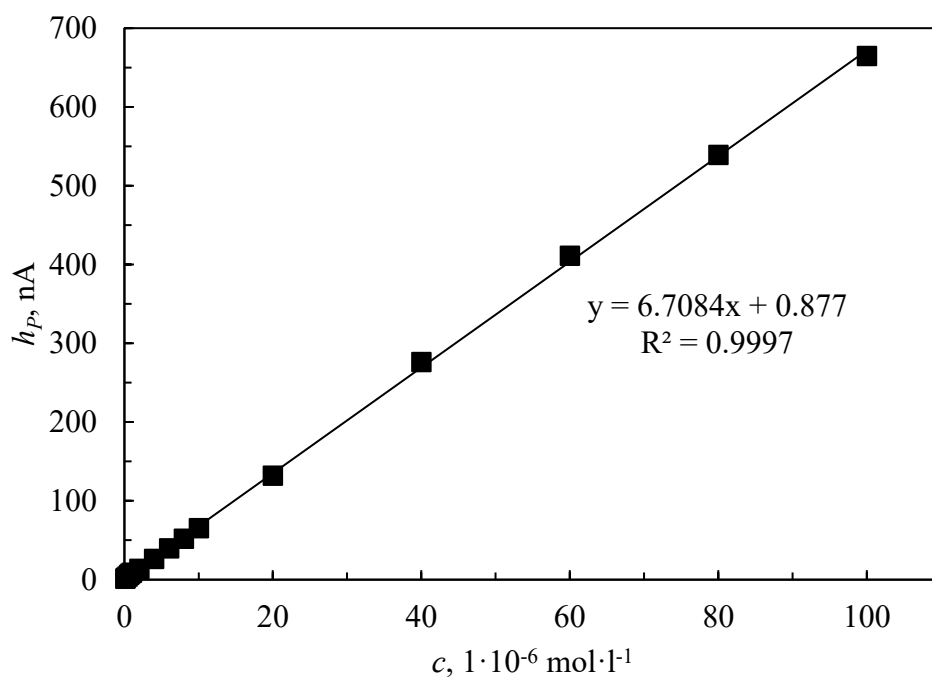
Obr.19 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



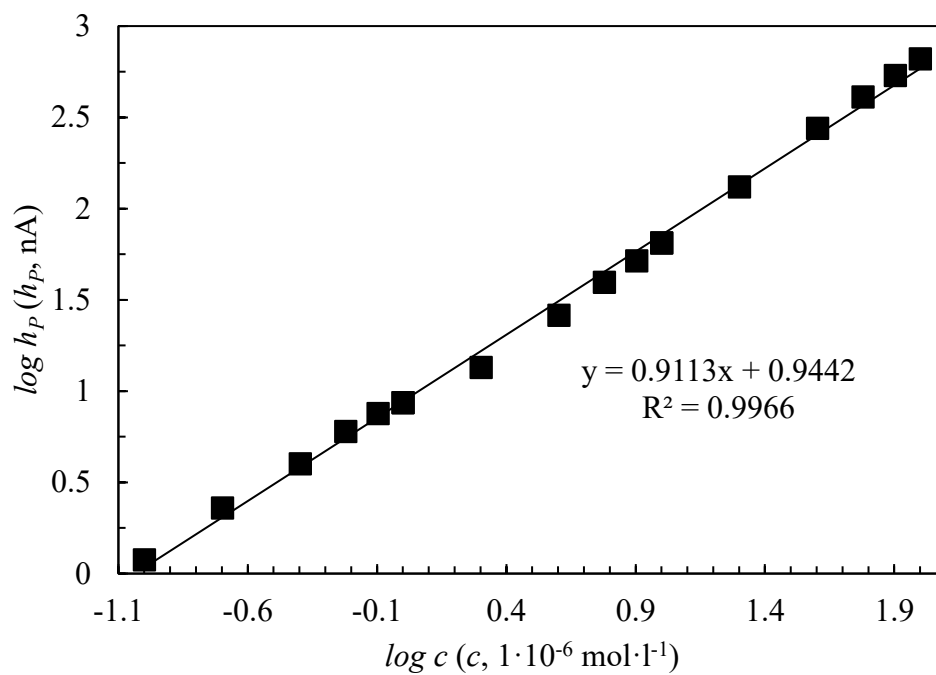
Obr.20 Chromatogramy koncentrační závislosti 5-HIAA, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, v prostředí methanolu a AF-pufříru o pH 3,0 (50:50, v/v), Koncentrace [mol.l^{-1}]: $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$), F : $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$



Obr.21 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



Obr.22 Závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



Obr.23 Logaritmická závislost výšky píku na koncentraci 5-HIAA v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient

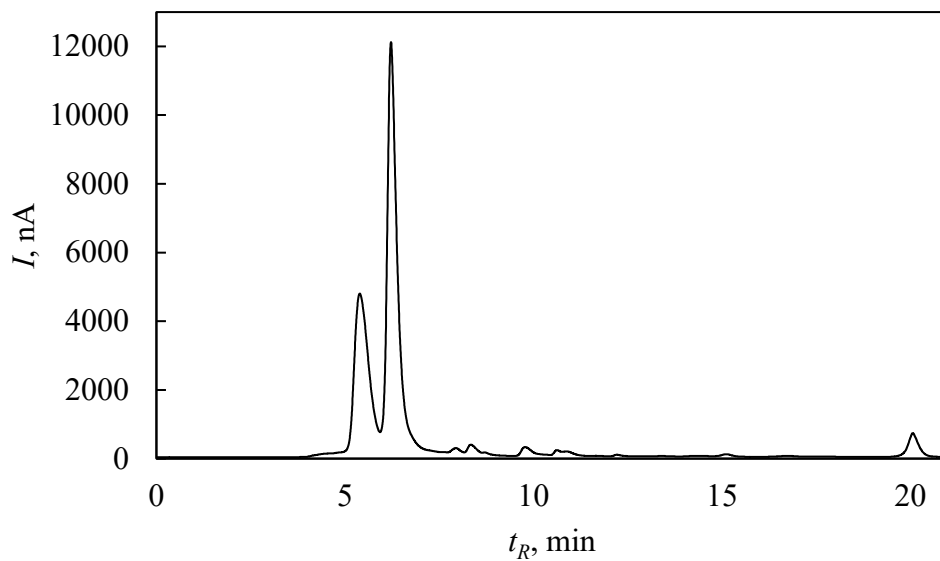
3.4. Stanovení 5-HIAA v reálné matrici

S využitím předešlé optimalizace byla 5-hydroxyindolactová kyselina přímo stanovována v reálné matrici moči. Vzorek byl před nástřikem do chromatografického systému pouze zfiltrován a jinak nebyl nikterak upravován. Měření bylo opět sledováno pomocí spektrofotometrické a elektrochemické detekce. Z dosažených výsledků bylo provedeno srovnání obou metod detekce.

3.4.1 Vývoj gradientu – optimalizace separace

Chromatogram vzorku moči, měřený za stejných podmínek jako koncentrační závislosti (Obr.24), ukazuje, že v čase 5-7 minuty (t_R 5-HIAA = 6,20 min) se eluuje největší část obsažených látek ve vzorku. Oddělení analytu od těchto látek je možné změnou zastoupení organického modifikátoru v mobilní fázi pomocí gradientového programu. Při sledování programu gradientové eluce je třeba brát v potaz i poměrně dlouhý mrtvý čas kolony, který dosahuje času až 4 minut, všechny změny v gradientu se projeví s tímto zpožděním.

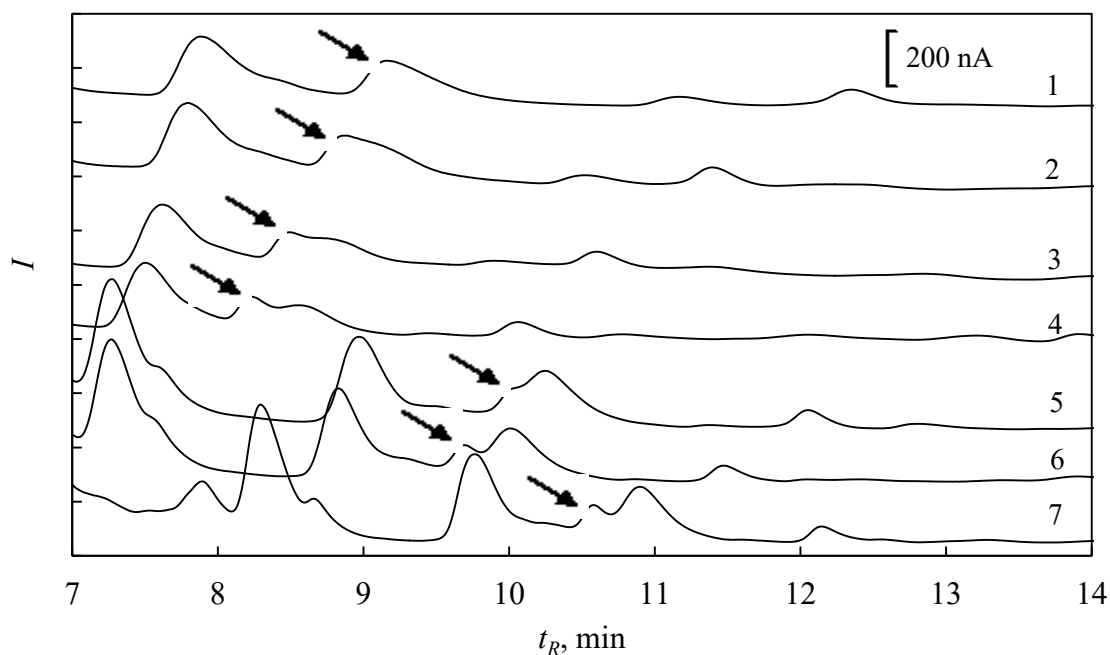
Vývoj programu gradientové eluce shrnuje Obr.25 a Tab. 7. Pro další zpracování vzorku byl vybrán následující program: V čase iniciace je poměr organická fáze/vodná fáze 10/90 (v/v), poté se složky mobilní fáze lineárně mísí až do času $t=10$ min, kdy je poměr 80/20 (v/v). Následuje udržení nastaveného poměru po dobu 5 minut a dochází tak k proplachu kolony silně methanolickým prostředím. V čase $t=15$ min se nastavení opět vrací do původního iniciačního poměru 10/90 (v/v). Posledních 5 minut dochází k eluci zbývajících látek až do $t=20$ min a zároveň je kolona připravována na nástřik nového vzorku ihned po skončení analýzy. Retenční čas 5-HIAA je pak pro UV detektor 10,5 min a pro elektrochemický detektor 10,6 min.



Obr.24 Chromatogram vzorku moči, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0 (50:50, v/v), kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μ m), F: 0,5 ml·min⁻¹

Tab. 7 Testované programy gradientové eluce, vyznačen vybraný program

Program	t , min		
	0 min	10 min	15 min
	Poměr MeOH/AF-pufr pH 3		
1	30/70	50/50	80/20
2	30/70	60/40	80/20
3	30/70	70/30	80/20
4	30/70	80/20	80/20
5	20/80	70/30	80/20
6	20/80	80/20	80/20
7	10/90	80/20	80/20



Obr.25 Jednotlivé chromatogramy vývoje programu gradientu, číslo křivky odpovídá gradientovému programu v Tab.7, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μ m), F : 0,5 ml·min⁻¹

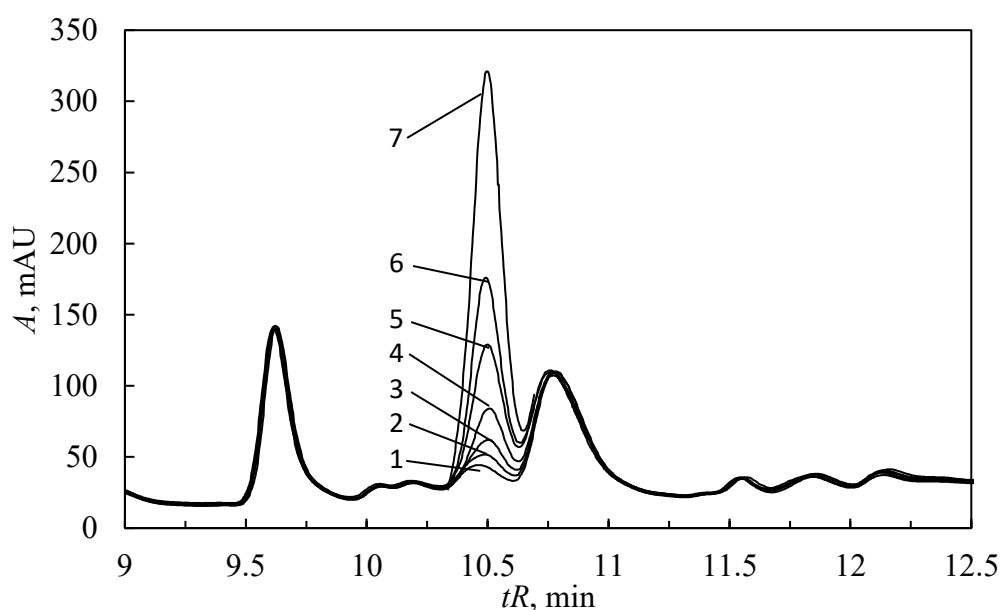
3.4.2 Kalibrační závislost v matrici

Pro ověření linearity kalibrační závislosti přímo v matrici bylo do matrice moči přidáno šest standardních přídavků 5-HIAA o koncentracích 10, 25, 50, 100, 150 a 300 $1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹. Tato koncentrační řada byla navržena tak, aby pokryla rozsah možné koncentrace 5-HIAA ve vzorku. Byly proměřeny chromatogramy při optimalizovaných podmínkách separace a detekce a lineární regresí vyhodnoceny parametry závislosti.

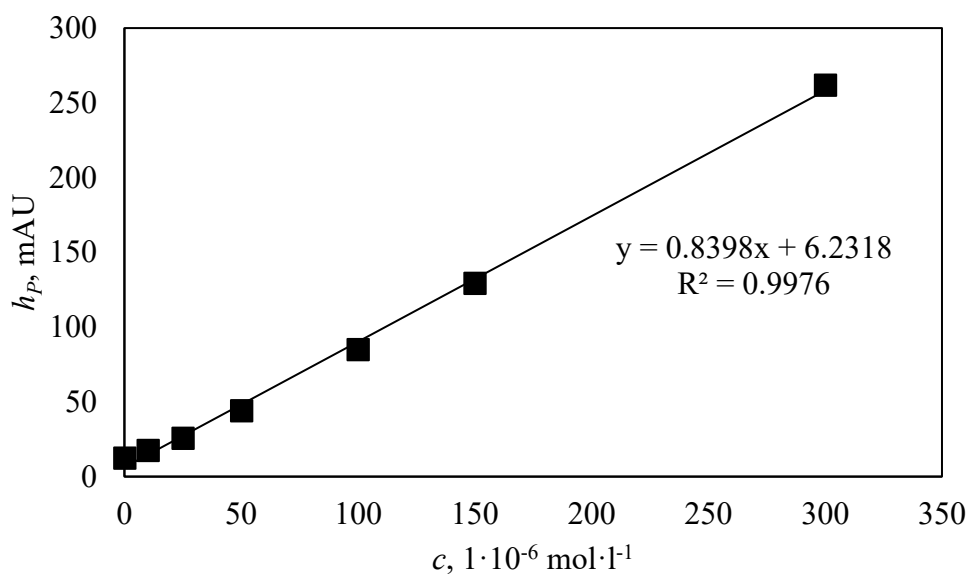
3.4.2.1. Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrická detekce probíhala na UV detektoru při vlnové délce 276 nm. Výsledné chromatogramy měřené v matrici moči jsou uvedeny na obrázku (Obr.26). K nim přísluší graf s kalibrační přímkou a rovnicí lineární regrese vyhodnocené z výšek píku (Obr.27) a logaritmická forma kalibrační přímky (Obr.28) s uvedenou rovnicí lineární regrese.

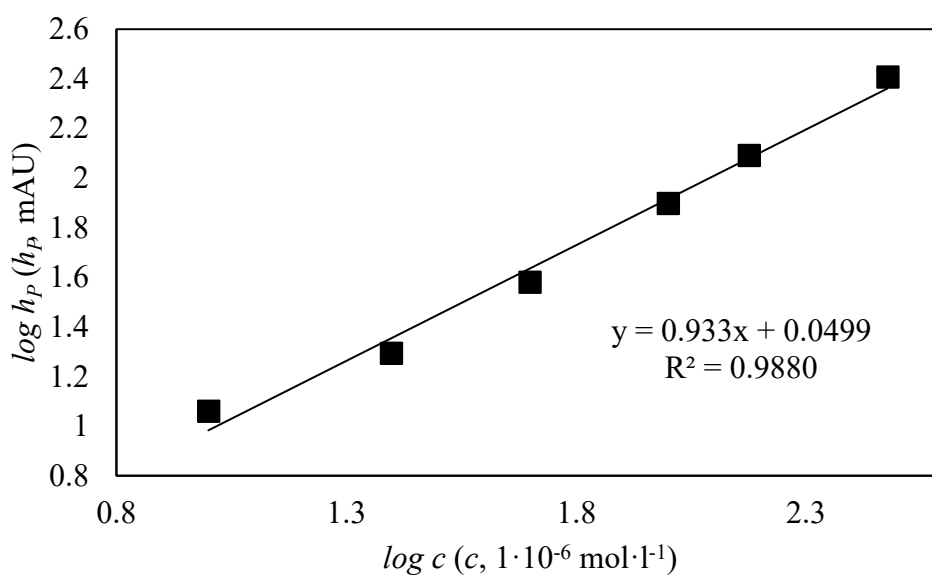
Kalibrační závislost je lineární v celém koncentračním rozmezí. Korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,9976. Linearitu závislosti potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota je blízká jedné. V porovnání se spektrofotometrickou detekcí kalibrace v deionizované vodě jsou hodnoty dle očekávání mírně horší, to je způsobeno složitostí matrice, stanovení komplikují píky v blízkosti sledované látky. Úsek závislosti odpovídá přítomnosti 5-HIAA v matrici vzorku.



Obr.26 Chromatogramy kalibrační závislosti 5-HIAA ve vzorku, UV-detekce, $\lambda=276$ nm, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0, gradientový program 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufu, v/v), koncentrace [$1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹]: vzorek(1), 10(2), 25(3), 50(4), 100(5), 150(6), 300(7) F: 0,5 ml.min⁻¹, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μ m)



Obr.27 závislost výšky píku na koncentraci standardního přídatku 5-HIAA v matrici moči, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



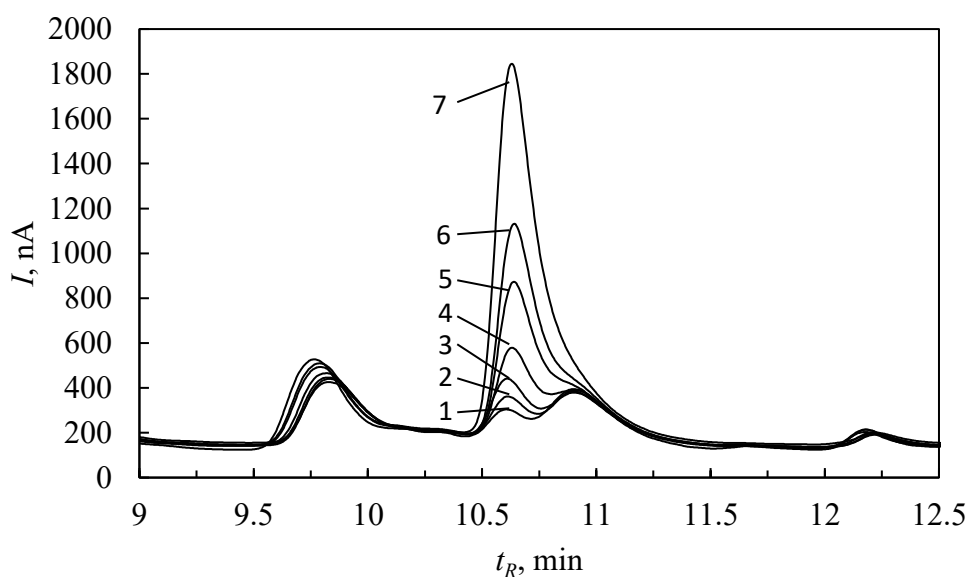
Obr.28 Logaritmická závislost výšky píku na koncentraci standardního přídatku 5-HIAA v matrici, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient

3.4.2.2. Elektrochemická detekce

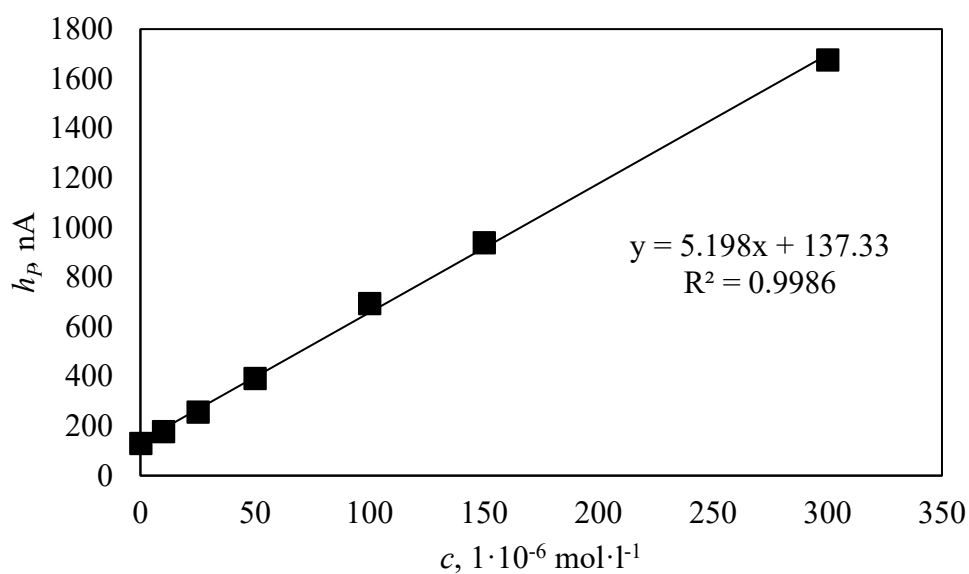
Elektrochemická detekce téže koncentrační řady probíhala na amperometrickém detektoru za použití borem dopované diamantové filmové elektrody při potenciálu pracovní elektrody 1,1 V. Výsledné chromatogramy měřené v matrici moči jsou uvedeny na obrázku

(Obr.29), s příslušným grafem kalibrační přímky a lineární regrese (Obr.30). Vyhodnoceny byly výšky píku. Závislost popisuje i logaritmická forma kalibrační přímky (Obr.31) opět s uvedenou rovnicí lineární regrese.

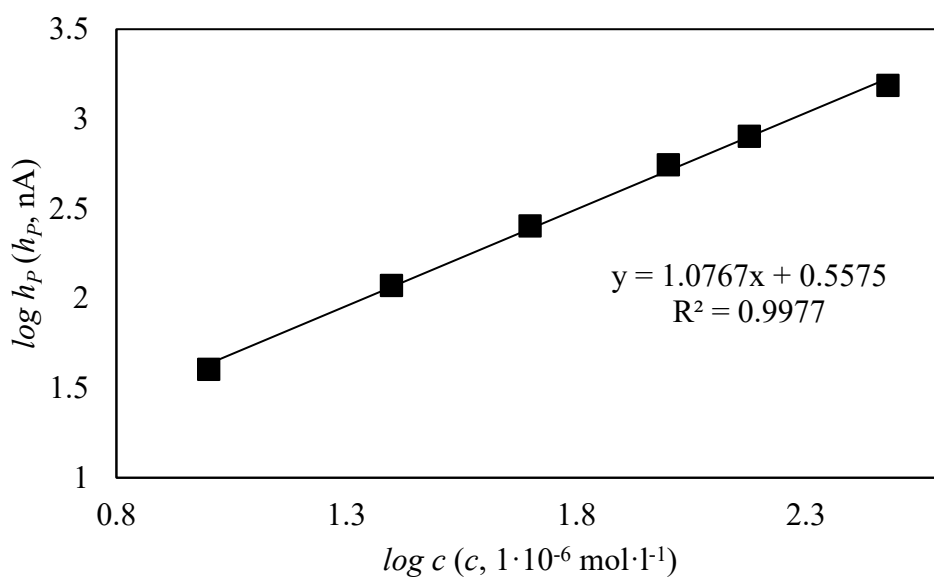
Kalibrační závislost této detekce je více lineární než UV detekce. Korelační koeficienty jsou 0,9986. Linearitu závislosti potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota je blízká jedné. V porovnání s elektrochemickou detekcí kalibrace v deionizované vodě je linearita horší, to je způsobeno především složitostí matrice. Faktorem zhoršující vyhodnocování signálu je blízkost interferujícího píku. Z toho důvodu je možné odečítat pouze výšku píku, nikoli plochu píku a v celé práci je zvolen tento způsob vyhodnocování. Při UV detekci má interferující pík vždy větší odezvu než stanovovaný pík, zatímco při elektrochemické bývají výšky podobné. To nasvědčuje větší selektivitě elektrochemické detekce.



Obr.29 Chromatogramy kalibrační závislosti 5-HIAA ve vzorku, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0, gradientový program 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr,v/v), koncentrace [$1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹]: vzorek(1), 10(2), 25(3), 50(4), 100(5), 150(6), 300(7) F: 0,5 ml·min⁻¹, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5μm)



Obr.30 Závislost výšky píku na koncentraci standardního přídatku 5-HIAA v matrici, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient



Obr.31 Logaritmická závislost výšky píku na koncentraci standardního přídatku 5-HIAA v matrici, vypočtena lineární regresní rovnice a korelační koeficient

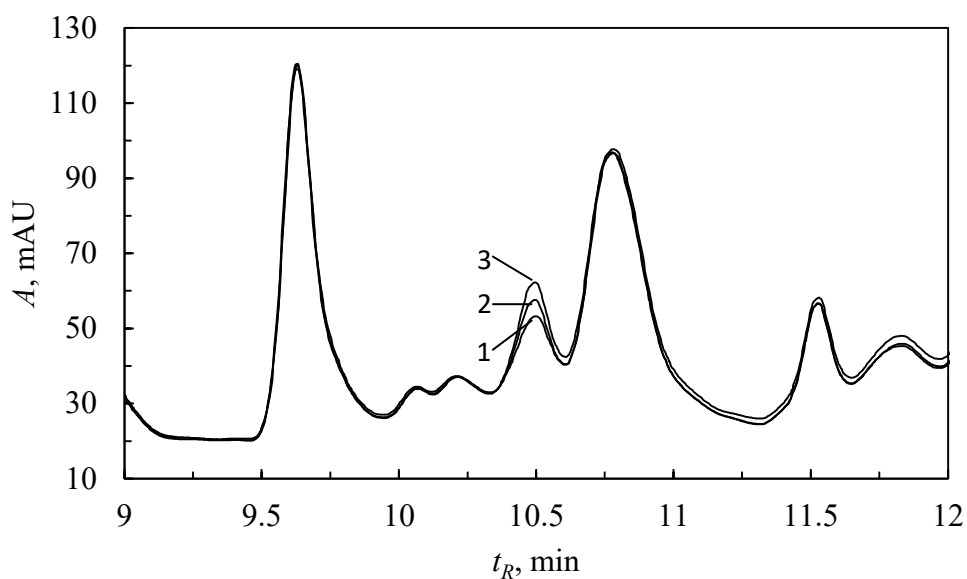
3.5. Stanovení 5-HIAA v moči metodou standardního přídavku

Byly provedeny tři série stanovení v neředěných vzorcích se standardními přídávky 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-HIAA použitím spektrofotometrické (Obr.32) a elektrochemické (Obr.34) detekce při optimalizovaných podmínkách separace a detekce. Podmínky separace byly: kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5\mu\text{m}$), průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, složení mobilní fáze methanol s acetátofosfátovým pufrům o pH 3, gradientová eluce s následujícím programem gradientu: 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr,v/v), dávkováno bylo $20 \mu\text{l}$ vzorku. UV spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 276 nm a amperometrická detekce za použití borem dopované diamantové filmové elektrody při potenciálu pracovní elektrody 1,1 V oproti argentschloridové referenční elektrodě.

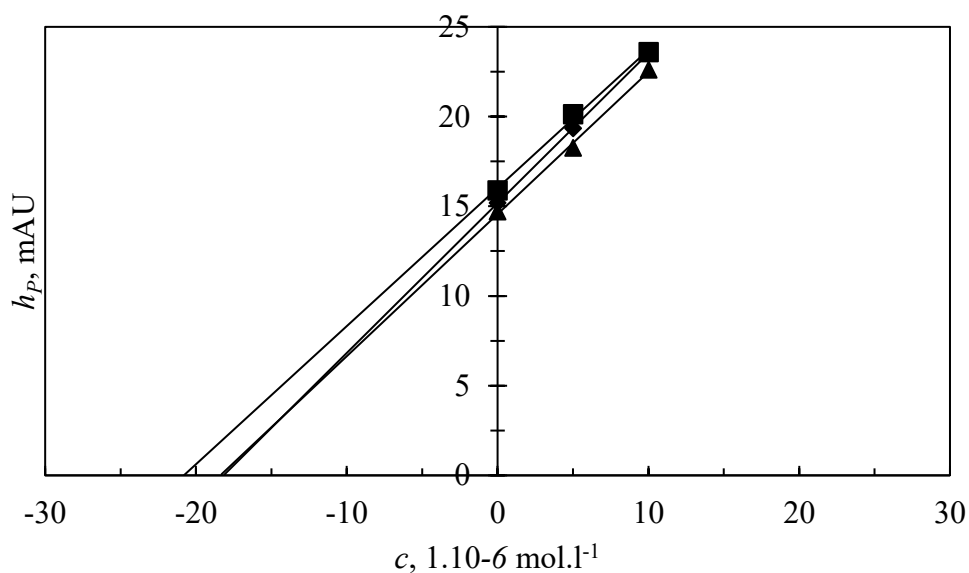
Linearita koncentrační závislosti 5-HIAA, nutná podmínka pro stanovení analytu metodou standardního přídavku, byla ověřena jak v matrici deionizované vody, tak matrici moči. Úspěšnou optimalizací separace a detekce metody se podařilo studovanou látku stanovit pomocí obou detektorů. Výsledky stanovení shrnuje tabulka (Tab. 8) včetně statistického zpracování. Koncentrace činila pro spektrofotometrickou metodu $(19.12 \pm 3.26) \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($s_r = 6.26 \%$) a pro elektrochemickou metodu. $(23.86 \pm 2.69) \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($s_r = 3.42 \%$).

Tab. 8 vypočítané výsledky stanovených koncentrací 5-HIAA v moči se statistickým zpracováním a mezi detekcí, metody UV a ED

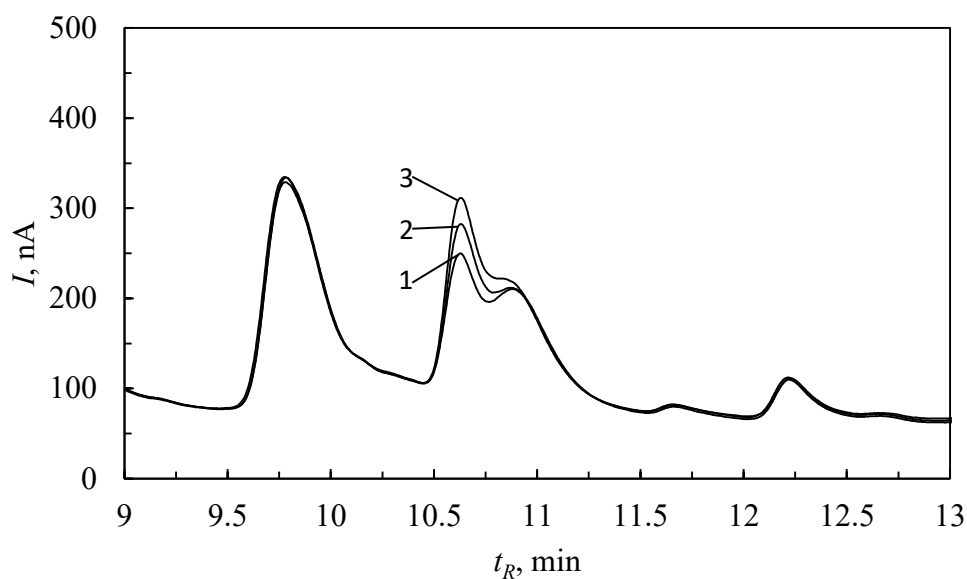
	UV-detekce	ED-detekce
Měření	$c, 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$c, 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1	20.81	24.53
2	18.17	24.34
3	18.38	22.71
průměr	19.1	23.9
$L_{1,2}$	3.9	2.7
s	1.2	0.82
$s_r, \%$	6.3	3.4



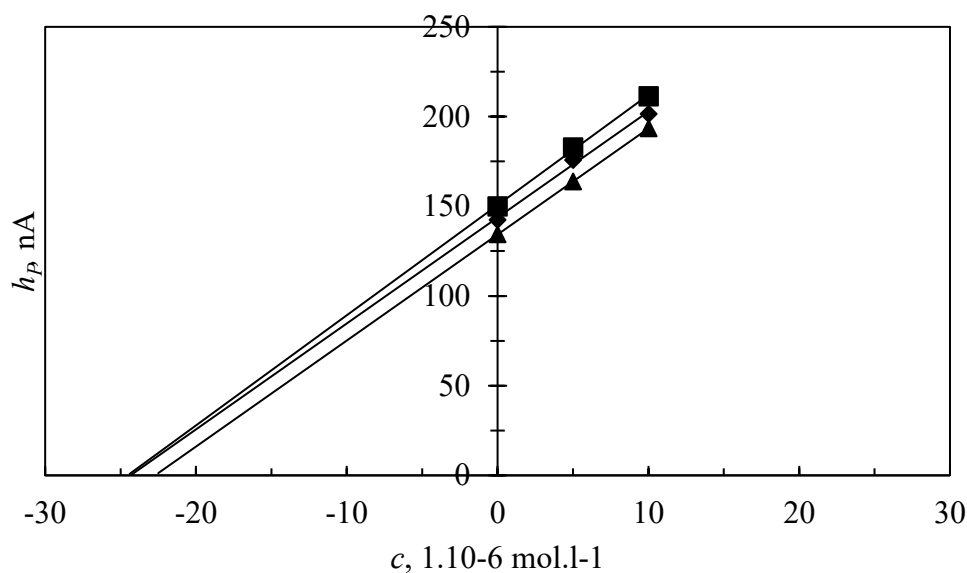
Obr.32 Chromatogramy standardních přídavek 5-HIAA do vzorku moči, UV detekce, $\lambda=276$ nm, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0, gradientový program 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr, v/v), koncentrace přídavek $[1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}]$: vzorek(1), 5(2), 10(3), $F: 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5\mu\text{m}$)



Obr.33 Závislost výšky píku na koncentraci standardního přídavku 5-HIAA v matrici, UV detekce, $\lambda=276$ nm



Obr.34 Chromatogramy standardních přísadků 5-HIAA do vzorku moči, pracovní elektroda BDDFE, E_{prac} : 1,1 V, v prostředí methanolu a AF-pufu o pH 3,0, gradientový program 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr, v/v), koncentrace přísadků $[1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}]$: vzorek(1), 5(2), 10(3), F : $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 ($5 \mu\text{m}$)



Obr.35 závislost výšky píku na koncentraci standardního přísadku 5-HIAA v matrici, elektrochemická detekce na BDDFE, E_{prac} : 1,1 V

Závěr

Cílem této práce bylo hledání optimálních podmínek pro stanovení biomarkeru 5-hydroxyindolactové kyseliny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na borem dopované diamantové filmové elektrodě s cílem dosažení co nejmenší meze detekce a stanovitelnosti.

Metoda stanovení byla úspěšně optimalizována, podmínky separace jež byly: kolona LiChroCART® 250-4, Purospher® RP-18 (5 μ m), průtoková rychlost 0,5 ml·min⁻¹, složení mobilní fáze methanol s acetátosfátovým pufrem o pH 3, gradientová eluce s programem gradientu 0 min: 10/90, 10 min: 80/20, 15 min 80/20 (MeOH/AF-pufr, v/v), Optimalizovány byly i podmínky detekce: spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 276 nm a amperometrická detekce za použití borem dopované diamantové filmové elektrody při potenciálu pracovní elektrody 1,1 V oproti argentochloridové referenční elektrodě.

Po proměření kalibrační závislosti standardu 5-HIAA v deionizované vodě bylo na základě poměru signál/šum pro spektrofotometrickou detekci dosaženo meze detekce $8,84 \cdot 10^{-8}$ mol·l⁻¹ a meze stanovitelnosti $2,95 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹, v případě elektrochemické detekce bylo dosaženo meze detekce $1,19 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ a meze stanovitelnosti $3,96 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹.

Závěrem bylo provedení stanovení studované látky ve vzorku moči. Koncentrace 5-hydroxyindolactové kyseliny bylo stanoveno spektrofotometricky jako $(19.12 \pm 3.26) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 6.26$ %) a elektrochemicky jako $(23.86 \pm 2.69) \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ ($s_r = 3.42$ %).

Reference

- [1] Gogas H., Eggermont A. M. M., Hauschild A., Hersey P., Mohr P., Schadendorf D., Spatz A., Dummer R.: Biomarkers in melanoma *Annals of Oncology* **20**, 8-13 (2009)
- [2] G. Eisenhofer G., Whitley R.J., Rosano T.G.: *Catecholamines and serotonin* Dostupné z URL: <<https://basicmedicalkey.com/catecholamines-and-serotonin/>> [cit. 22.8.2017]
- [3] Zeng P., Li H., Lu P.-H., Zhou L.-N., Tang M., Liu C.-Y., Chen M.-B.: Prognostic value of CD146 in solid tumor: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scientific reports* **7**:4223 (2017)
- [4] Anantaraju H. S, Battu M. B., Viswanadha S., Sriram D., Yogeewari P.: Cathepsin D inhibitors as potential therapeutics for breast cancer treatment: Molecular docking and bioevaluation against triple-negative and triple-positive breast cancers. *Molecular Diversity* **20**, 521-535 (2016)
- [5] Loosen S. H., Neumann U. P., Trautwein C., Roderburg C., Luedde T.: Current and future biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Tumor Biology* **39(6)**:1010428317692231 (2017)
- [6] Deng H., Wang J. M., Li M., Tang R., Tang K., Su Y., Hou Y., Zhang J.: Long non-coding RNAs: New biomarkers for prognosis and diagnosis of colon cancer. *Tumor Biology* **39(6)**:1010428317706332 (2017)
- [7] Jia Y., Chen Y., Wang Q., Jayasinghe U., Luo X., Wei Q., Wang J., Xiong H., Chen C., Xu B., Hu W., Wang L., Zhao W., Zhou J.: Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget* **20**, 41717-41733 (2017)
- [8] Matsuzaki H., Kumagai-Takei N., Lee S., Maeda M., Sada N., Hatayama T., Yamamoto S., Ikeda M., Yoshitome K., Min Y., Nishimura Y., Otsuki T.: Search for biomarkers of asbestos exposure and asbestos-induced cancers in investigations of the immunological effect of asbestos. *Environmental Health and Preventive Medicine* **22**:53 (2017)
- [9] Modlin I. M., Bodei L., Kidd M.: Neuroendocrine tumor biomarkers: From monoanalytes to transcripts and algorithms. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* **30**, 59-77 (2016)
- [10] Shi D. D., Yuppa D. P., Dutton T., Brais L. K., Minden S. L., Braun I. M., Kulke M. H., Chan J. A., Meyer F. L.: Retrospective Review of Serotonergic Medication Tolerability in

Patients With Neuroendocrine Tumors With Biochemically Proven Carcinoid Syndrome. *Cancer* **123**, 2735-2742 (2017)

[11] Barkmanová J.: *Karcinoid*. Maxdorf, Praha 2003, s. 3-6

[12] American society of clinical oncology: *Carcinoid tumors: statistics*. Dostupné z URL: <<http://www.cancer.net/cancer-types/carcinoid-tumor/statistics>> [cit. 11.8.2017]

[13] Lionetto L., Lostia A. M., Stigliano A., Cardelli P., Simmaco M.: HPLC–mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumormarkers: Vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Clinica Chimica Acta* **398**, 53-56 (2008)

[14] Gut P., Waligórska-Stachura J., Czarnywojtek A., Sawicka-Gutaj A., Baczyk M., Ziemnicka K., Fischbach J., Woliński K., Kaznowski J., Wrotkowska E., Ruchała M.: Management of the hormonal syndrome of neuroendocrine tumors. *Archives of Medical Science* **13**, 515-524 (2017)

[15] Kukle M. H., O'Dorisio T., Phan A., Bergsland E., Laws L., Banks P., Freiman J., Frazier K., Jackson J., Yao J. C., Kvols L., Lapuerta P., Zambrowicz B., Fleming D., Sands A.: Telotristat etiprate, a novel serotonin synthesis inhibitor, in patients with carcinoid syndrome and diarrhea not adequately controlled by octreotide. *Endocrine-related Cancer* **21**, 705-714 (2014)

[16] Makrlíková A., Ktena E., Economou A., Fischer J., Navrátil T., Barek J., Vyskočil V.: Voltammetric Determination of Tumor Biomarkers for Neuroblastoma (Homovanillic Acid, Vanillylmandelic Acid, and 5-Hydroxyindole-3-acetic Acid) at Screen-printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis* **29**, 146-153 (2017)

[17] Lewczuk B., Ziolkowska N., Prusik M., Przybylska-Gornowicz B.: Diurnal Profiles of Melatonin Synthesis-Related Indoles, Catecholamines and Their Metabolites in the Duck Pineal Organ. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 12604-12630 (2014)

[18] de Jong D. H., Graham K. S., de Vries E. G., Kema I. P.: Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **868**, 28-33 (2008)

- [19] Mulder E. J., Oosterloo-Duinkerken A., Andreson G. M., de Vries E. G., Minderaa R. B., Kema I. P.: Automated on-line solid-phase extraction coupled with HPLC for measurement of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in urine. *Clinical Chemistry* **51**, 1698-1703 (2005)
- [20] Corcuff J. B., Chardon L., El Hajji Ridah I., Brossaud J.: Urinary sampling for 5HIAA and metanephrines determination: revisiting the recommendations. *Endocrine Connections* **6**, 87-98 (2017)
- [21] Deacon A. C.: The measurement of 5-hydroxyindoleacetic acid in urine. *Annals of Clinical Biochemistry* **31**, 215-232 (1994)
- [22] Akiyama T., Hayashi Y., Hanakoa Y., Shibata T., Akiyama M., Nakamura K, Tsuyusaki Y., Kubota M., Yoshinaga H., Kobayashi K.: Simultaneous measurement of monoamine metabolites and 5-methyltetrahydrofolate in the cerebrospinal fluid of children. *Clinica Chimica Acta* **465**, 5-10 (2017)
- [23] Miller A. G., Brown H., Degg T., Allen K., Keevil B. G.: Measurement of plasma 5-hydroxyindole acetic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry—Comparison with HPLC methodology. *Journal of Chromatography B* **878**, 695-699 (2010)
- [24] Sirén H., Karjalainen U.: Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **853**, 527-533 (1999)
- [25] Patel B. A., Arundell M., Parker K. H., Yeoman M. S., O'Hare D.: Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* **818**, 269-276 (2005)
- [26] Ishida J., Yakabe T., Nohta H., Yamaguchi M.: 6-Aminomethylphthalhydrazide as a highly sensitive chemiluminescence derivatization reagent for 5-hydroxyindoles in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **346**, 175-181 (1997)
- [27] Liu S., Chen Y., Wan P., Zhou C., Zhang S., Mo H.: Determination of 5-Hydroxyindole Acetic Acid by Electrochemical Methods with an Oxidized Glassy Carbon Electrode. *Electrochimica Acta* **216**, 528-534 (2016)
- [28] Liu Y., Jiang Y., Song W., Lu N., Zou M., Xu H., Yu Z.: Voltammetric determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in human gastric juice. *Talanta* **50**, 1261-1266 (2000)

- [29] Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Laboratoř endokrinologie a metabolismu (LEM) SOP-ÚLBLD-LEM-4, Dostupné z URL: <<http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1080>> [cit. 24.8.2017]
- [30] Diagnostika neuroendokrinních nádorů - laboratorní vyšetření Oldřich Louthan, IV. interní klinika, VFN, 1. LF UK Praha, Dostupné z URL: <<http://neuroendokrinni-nadory.cz/downloads/diagnostika-nen-vysetreni.pdf>> [cit. 24.8.2017]
- [31] Tellez M. R., Mamikunian G., O'Dorisio T. M., Vinik A. I., Woltering E. A.: A single fasting plasma 5-HIAA value correlates with 24-hour urinary 5-HIAA values and other biomarkers in midgut neuroendocrine tumors (NETs). *Pancreas* **42**, 405-410 (2013)
- [32] Cvačka, J.; Swain, G. M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenylů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chemické Listy* **96**, 33 – 38 (2002)
- [33] Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M., E., Macpherson J. V.: Examination of the factors affecting the electrochemical performance of oxygen-terminated polycrystalline boron-doped diamond electrodes. *Analytical Chemistry* **85**, 7230-7240 (2013)
- [34] Kapalka A., Fóti G., Comninellis C.: The importance of electrode material in environmental chemistry: Formation and reactivity of free hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta* **54**, 2018-2023 (2009)
- [35] Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické Listy* **103**, 469 – 478 (2009)
- [36] Silva E. L., Neto M. A., Fernandes A. J. S., Bastos A. C., Silva R. F., Zheludkevich M. L., Oliveira F. J.: Fast coating of ultramicroelectrodes with boron-doped nanocrystalline diamond. *Diamond and Related Materials* **19**, 1330-1335 (2010)
- [37] Pecková K., Musilová J., Barek J.: Boron-Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Critical reviews in analytical chemistry* **39**, 148-172 (2009)
- [38] Y. V. Pleskov: Electrochemistry of Diamond: A Review. *Russian Journal of Electrochemistry* **38**, 1275-1291 (2002)

- [39] Goeting C. H., Foord J. S., Marken F., Compton R. G.: Sonoelectrochemistry at tungsten-supported boron-doped CVD diamond electrodes. *Diamond and Related Materials* **8**, 824-829 (1999)
- [40] Ayres Z. J., Newland J. C., Newton M. E., Mandal S., Williams O. A., Macpherson J. V.: Impact of chemical vapour deposition plasma inhomogeneity on the spatial variation of sp² carbon in boron doped diamond electrodes. *Carbon* **121**, 434-442 (2017)
- [41] Jum'h I., Abdelhay A., Al-Taani H., Telfah A., Alnaief M., Rosiwal S.: Fabrication and application of boron doped diamond BDD electrode in olive mill wastewater treatment in Jordan. *Journal of Water Reuse and Desalination* **7**, 502-510 (2017)
- [42] Liang J., Gao C., Zhang L., Jiang L., Yang Z., Wang Z., Ji C., Le X., Rong C., Zhang J.: Studies on distribution of element contents in transient layer at interface between boron-doped diamond film electrode and tantalum substrate. *Applied Surface Science* **257**, 6063-6067 (2011)
- [43] Goeting C. H., Jones F., Foord J. S., Eklund J. C., Marken F., Compton R. G., Chalker P. R., Johnston C.: Electrochemistry at boron-doped diamond films grown on graphite substrates: redox - adsorption and deposition processes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **442**, 207-216 (1998)
- [44] Urtiaga, A.; Fernandez-Castro, P.; Gómez, P.; Ortiz, I.: Remediation of wastewaters containing tetrahydrofuran. Study of the electrochemical mineralization on BDD electrodes. *Chemical Engineering Journal* **239**, 341 – 350 (2014)
- [45] Panizza, M.; Cerisola, G.: Application of diamond electrodes to electrochemical processes. *Electrochimica Acta* **51**, 191 – 199 (2005)
- [46] Waldvogel, S. R.; Elser, B.: Electrochemical synthesis on boron-doped diamond. *Electrochimica Acta* **82**, 434 – 443 (2012)